

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGELA CAROLINA GUILLEN CALDAS

EFEITOS DO AUMENTO GRADUAL DE TEMPERATURA EM RESPOSTAS
METABÓLICAS DO PEIXE ANTÁRTICO *Nothotenia rossii* (RICHARDSON, 1844)

CURITIBA

2019

ANGELA CAROLINA GUILLEN CALDAS

EFEITOS DO AUMENTO GRADUAL DE TEMPERATURA EM RESPOSTAS
METABÓLICAS DO PEIXE ANTÁRTICO *Nothotenia rossii* (RICHARDSON, 1844)

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, no curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Lucélia Donatti

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Guillen, Angela Carolina

Efeitos do aumento gradual de temperatura em respostas metabólicas do peixe antártico *Nothotenia rossii* (Richardson, 1844). / Angela Carolina Guillen. – Curitiba, 2019.

159 p.: il.

Orientadora: Lucélia Donatti

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Peixe - Antártida 2. Metabolismo 3. Biomarcadores 4. Temperatura
I. Título II. Donatti, Lucélia, 1964- III. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 597.0998



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

ATA Nº452

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

No dia vinte e tres de agosto de dois mil e dezenove às 13:30 horas, na sala Sala 2 do Anexo da Botânica, UFPR - Centro Politécnico - Setor de Ciências Biológicas, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese da doutoranda **ANGELA CAROLINA GUILLEN CALDAS**, intitulada: **EFEITOS DO AUMENTO GRADUAL DE TEMPERATURA EM RESPOSTAS METABÓLICAS DO PEIXE ANTÁRTICO *Nothotenia rossii* (RICHARDSON, 1844)**, sob orientação da Profa. Dra. LUCELIA DONATTI. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, foi constituída pelos seguintes Membros: LUCELIA DONATTI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), VIVIANE PRODOCIMO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), MARITANA MELA PRODOCIMO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ANITA NISHIYAMA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), TATIANA HERRERIAS (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela aprovação. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, LUCELIA DONATTI, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 23 de Agosto de 2019.

LUCELIA DONATTI

Presidente da Banca Examinadora

VIVIANE PRODOCIMO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

MARITANA MELA PRODOCIMO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

ANITA NISHIYAMA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

TATIANA HERRERIAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE)





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANGELA CAROLINA GUILLEN CALDAS** intitulada: **EFEITOS DO AUMENTO GRADUAL DE TEMPERATURA EM RESPOSTAS METABÓLICAS DO PEIXE ANTÁRTICO *Nothotenia rossii* (RICHARDSON, 1844)**, sob orientação da Profa. Dra. LUCELIA DONATTI, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 23 de Agosto de 2019.

LUCELIA DONATTI

Presidente da Banca Examinadora

VIVIANE PRODOCIMO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

MARITANA MELA PRODOCIMO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

ANITA NISHIYAMA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

TATIANA HERRERIAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE)



Dedico este trabalho não à memória,
mas à presença de Irene e Antônio, meus avôs.

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar meu agradecimento a todos aqueles que estiveram envolvidos direta ou indiretamente na realização deste trabalho e a todos os professores que, ao longo de minha trajetória acadêmica me deixaram marcas profundas de amabilidade, acolhimento e responsabilidade, mostrando que a docência trata-se muito mais de servir que ser servido.

Por isso, gostaria de agradecer à minha orientadora Prof. Dra Lucélia Donatti que me deu a oportunidade de entrar no caminho do doutorado com um grande voto de confiança, creio que esse foi o guia desse percurso: confiança. Agradeço por se preocupar com o aluno no seu aspecto integral, pela sinceridade e liberdade que me oportunizou. São poucos como a Lucélia.

Agradeço às meninas do laboratório Priscila, Maria Rosa, Thaylise, Mariana, Tânia, Letícia e Elen, e ao Douglas, por toda a ajuda e por proporcionarem um excelente ambiente de trabalho. À Elen por ter proporcionado tardes divertidas e filosóficas.

Ao Marcelo Eduardo Borges pela ajuda na elaboração estatística e pelas inúmeras consultas matemáticas.

A Prof. Dra Tatiana Herrerias pela disposição em dividir seus conhecimentos e ajudar a estruturar as ideias.

Aos membros da banca de avaliação dos relatórios anuais, Profa. Dra. Marisa Fernandes de Castilho e Prof. Dra Katya Naliwaiko pelas contribuições e visões diferentes sobre o projeto.

À meu marido, meu maior incentivador, Gustavo, que segue acreditando em mim mais do que eu mesma. Ele é meu alicerce.

Às minhas pequenas, Catarina, Olívia e Teresa que são a causa da minha alegria e perseverança.

À Cleusa, minha companheira na vida doméstica, que muito me ajudou nesses anos todos.

Às professoras Dras Anita Nishiyama, Viviane Prodócimo, Maritana Mela Prodócimo e Tatiana Herrerias, em antecipação, por terem aceitado compor minha banca de defesa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR e aos professores que contribuíram para a minha formação.

Ao Programa Antártico Brasileiro, Marinha do Brasil e Força Aérea Brasileira, pelo apoio logístico para a execução dos experimentos na Estação Antártica Comandante Ferraz durante as Expedições Antárticas.

Ao INCT-APA pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa.

“Omnia in bonum”

Rom 8:28

RESUMO

Peixes antárticos são altamente adaptados a viver em ambientes termicamente frios e estáveis sendo, portanto, vulneráveis aos aumentos de temperatura relatados no oceano e continente Antártico. Diante de agentes estressores os organismos podem contar com sua plasticidade fenotípica que pode lhe conferir uma capacidade de aclimação. Um dos fatores que influencia a resposta ao estresse é a magnitude do agente estressor que quanto menor, potencialmente possibilita maiores ajustes de plasticidade. O presente trabalho verificou o efeito da temperatura de aclimação nos níveis de parâmetros enzimáticos e não enzimáticos dos metabolismos energético de carboidratos e oxidativo e de defesas antioxidantes nos tecidos renal, branquial, hepático e encefálico. Também analisou parâmetros plasmáticos e enzimas osmo-reguladoras em rim e brânquias de *Nothotenia rossii*, submetidos à mudança gradual de temperatura de 0,5 °C / dia, até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem atingidas. Quanto ao metabolismo de carboidratos sob o efeito da taxa de aclimação de 0,5°C / dia o tecido branquial apresentou um aumento da atividade da fosfofrutoquinase (PFK) em todas as temperaturas experimentais e o renal da malato desidrogenase (MDH) (2°C), glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (2°C) e glicogênio fosforilase (GP) (6°C). No fígado houve aumento na concentração de lactato (6°C) e, no encéfalo, aumento da atividade da GP (6°C). O metabolismo energético de carboidratos em *N. rossii* apresentou-se vulnerável à temperatura em interação com o tempo e, dentre os órgãos, o rim sofreu influência isolada da temperatura. O metabolismo energético para mitigar o estresse térmico nessa espécie, nessas condições experimentais, possivelmente ativa as vias da glicólise, gliconeogênese e glicogenólise. Quanto aos níveis de parâmetros plasmáticos, osmorregulatórios e do metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes, em *N. rossii*, o tecido branquial apresentou aumento da atividade da glutathione-S-transferase (GST) (2°C) e o renal da H⁺-ATPase (2°C). No plasma houve diminuição da concentração de proteínas totais e globulinas em todas as temperaturas experimentais. No fígado houve aumento constante na concentração de MDA como indicativo de lipoperoxidação em todas as temperaturas experimentais e da glutathione reduzida (GSH) em 2°C, possivelmente relacionadas. Essas respostas podem ser em decorrência da alteração de pH ou ainda à uma prejudicada síntese protéica hepática. Nos órgãos analisados de *N. rossii* o metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes não se apresentou vulnerável ao fator temperatura isoladamente à exceção do fígado provavelmente por sua vulnerabilidade à lipoperoxidação. As alterações demonstram que o aumento gradual de temperatura pode causar respostas opostas ao modelo de choque térmico. Em ambos os metabolismos as respostas foram tecido específicas e indicam a presença de plasticidade térmica e tentativa de regulação para mitigar o estresse térmico em *N. rossii*.

Palavras-chave: Peixes antárticos. Notothenidae. Temperatura. Aquecimento. Metabolismo. Biomarcadores.

ABSTRACT

Antarctic fish are highly adapted to live in thermally cold and stable environments and are therefore vulnerable to reported temperature increases in the Antarctic ocean and continent. Faced with stressors, organisms can count on their phenotypic plasticity that can give them a high capacity for acclimatization. One of the factors influencing stress response is the magnitude of the stressor which, the smaller, potentially enables greater plasticity adjustments. The present study verified the effect of the acclimatization temperature on the enzymatic and non-enzymatic parameter levels of carbohydrate and oxidative energy metabolism and antioxidant defenses in renal, gill, hepatic and encephalic tissues. and gills of *Nothotenia rossii*, subjected to a gradual temperature change of 0.5 ° C / day, until the temperatures of 2, 4, 6 and 8 ° C were reached. Regarding carbohydrate metabolism under the acclimatization rate of 0.5°C / day, the gill tissue presented increased phosphofructokinase (PFK) activity at all experimental temperatures and renal malate dehydrogenase (MDH) (2 ° C), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) (2 ° C) and glycogen phosphorylase (GP) (6 ° C). In the liver there was an increase in lactate concentration (6 ° C) and in the brain an increase in GP activity (6 ° C). The energy metabolism of carbohydrates in *N. rossii* was vulnerable to temperature in interaction with time and, among the organs, the kidney was isolated influence of temperature. Energy metabolism to mitigate heat stress in this species, under these experimental conditions, possibly activates the pathways of glycolysis, gluconeogenesis and glycogenolysis. Regarding the levels of plasma, osmoregulatory parameters and oxidative metabolism and antioxidant defenses, in *N. rossii*, the gill tissue presented increased glutathione-S-transferase (GST) activity (2 ° C) and renal H⁺-ATPase (2 ° C). In plasma there was a decrease in total protein and globulin concentration at all experimental temperatures. In the liver there was a steady increase in MDA concentration as indicative of lipoperoxidation at all experimental temperatures and reduced glutathione (GSH) at 2 ° C, possibly related. These responses may be due to pH change or impaired hepatic protein synthesis. In the *N. rossii* organs analyzed, oxidative metabolism and antioxidant defenses were not vulnerable to temperature alone, except for the liver probably due to its vulnerability to lipoperoxidation. The changes demonstrate that gradual temperature rise can cause opposite responses to the thermal shock model. In both metabolism the responses were tissue specific and indicate the presence of thermal plasticity and attempted regulation to mitigate heat stress in *N. rossii*.

Keywords: Antarctic fish. Notothenidae. Temperature. Warming. Metabolism. Biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO GERAL

FIGURA 1- O OCEANO ANTÁRTICO E O SISTEMA DE CORRENTES OCEÂNICAS QUE CIRCUNDAM O CONTINENTE.....	21
FIGURA 2 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MECANISMO DE PLASTICIDADE FENOTÍPICA FRENTE A UM AGENTE ESTRESSOR	25

CAPÍTULO I

FIGURA 1 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO BRANQUIAL DE <i>Notothenia rossii</i>	45
FIGURA 2 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO RENAL DE <i>Notothenia rossii</i>	46
FIGURA 3 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO HEPÁTICO DE <i>Notothenia rossii</i>	47
FIGURA 4 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO ENCEFÁLICO DE <i>Notothenia rossii</i>	48
FIGURA 5- CONCENTRAÇÃO DE METABÓLICOS INTERMEDIÁRIOS NO TECIDO BRANQUIAL EM <i>Notothenia rossii</i>	50
FIGURA 6- CONCENTRAÇÃO DE METABÓLICOS INTERMEDIÁRIOS NO TECIDO RENAL EM <i>Notothenia rossii</i>	51
FIGURA 7 CONCENTRAÇÃO DE METABÓLICOS INTERMEDIÁRIOS NO TECIDO HEPÁTICO EM <i>Notothenia rossii</i>	52
FIGURA 8- ESQUEMA DE ALTERAÇÕES DE BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO AO LONGO DO TEMPO EM <i>Notothenia rossii</i> QUANDO SUBMETIDOS Á ESTRESSE TÉRMICO GRADUAL.....	54

CAPÍTULO II

FIGURA 1- NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO BRANQUIAL EM <i>Notothenia rossii</i>	83
FIGURA 2- NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO RENAL EM <i>Notothenia rossii</i>	84

FIGURA 3- NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO HEPÁTICO EM <i>Notothenia rossii</i>	85
FIGURA 4- NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO ENCEFÁLICO EM <i>Notothenia rossii</i>	86
FIGURA 5 – CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS CELULARES E TIÓIS NÃO PROTÉICOS (GSH) NO TECIDO BRANQUIAL EM <i>Notothenia rossii</i>	88
FIGURA 6 – CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS CELULARES E TIÓIS NÃO PROTÉICOS (GSH) NO TECIDO RENAL EM <i>Notothenia rossii</i>	89
FIGURA 7 – CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS CELULARES E TIÓIS NÃO PROTÉICOS (GSH) NO TECIDO HEPÁTICO EM <i>Notothenia rossii</i>	90
FIGURA 8 – CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS CELULARES E TIÓIS NÃO PROTÉICOS (GSH) NO TECIDO ENCEFÁLICO EM <i>Notothenia rossii</i>	91
FIGURA 9- CONCENTRAÇÕES DE MARCADORES E NÍVEIS DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS NO PLASMA EM <i>Notothenia rossii</i>	94
FIGURA 10- CONCENTRAÇÕES DE PARÂMETROS METABÓLICOS NO PLASMA DE <i>Notothenia rossii</i>	95
FIGURA 11- CONCENTRAÇÕES DE PARÂMETROS OSMO-IÔNICOS NO PLASMA DE <i>Notothenia rossii</i>	97
FIGURA 12- NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS Na^+/K^+ ATPase e H^+ -ATPase BRANQUIAL EM <i>Notothenia rossii</i>	99
FIGURA 13- NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS OSMORREGULATÓRIAS Na^+/K^+ ATPase e H^+ -ATPase RENAL EM <i>Notothenia rossii</i>	100
FIGURA 14 - ESQUEMA DE ALTERAÇÕES DE BIOMARCADORES DO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES EM <i>Notothenia rossii</i>	102
FIGURA 15 – ALTERAÇÃO DE BIOMARCADORES EM <i>Notothenia rossii</i> E SUAS INTERRELAÇÕES	106

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1 – RESULTADOS DAS ANÁLISES UNIVARIADAS DOS BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM *Notothenia rossii*.....40

CAPÍTULO II

TABELA 1 – RESULTADOS DAS ANÁLISES UNIVARIADAS NAS RESPOSTAS DE BIOMARCADORES DO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES *Notothenia rossii*.....80

TABELA 2 – RESULTADOS DAS ANÁLISES UNIVARIADAS NAS RESPOSTAS DE ÍONS PLASMÁTICOS EM *Notothenia rossii*.....92

TABELA 3 – RESULTADOS DAS ANÁLISES UNIVARIADAS NAS RESPOSTAS DE METABÓLITOS PLASMÁTICOS EM *Notothenia rossii*.....92

TABELA 4 – RESULTADOS DAS ANÁLISES UNIVARIADAS EM RESPOSTAS DAS ENZIMAS Na⁺/ K⁺ ATPase e H⁺ATPase.....98

CAPÍTULO III

TABELA 1 – AGRUPAMENTO DE BIOMARCADORES PARA ANÁLISE MULTIVARIADA PARA CADA ÓRGÃO E METABOLISMO ANALISADO DE *Notothenia rossii*..... 122

TABELA 2- PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO BRANQUIAL DE *Notothenia rossii*.....123

TABELA 3 - PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO RENAL DE *Notothenia rossii*.....124

TABELA 4- PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO HEPÁTICO DE *Notothenia rossii*.....124

TABELA 5- PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO ENCEFÁLICO DE *Notothenia rossii*.....126

TABELA 6– PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DO TEMPO, TEMPERATURA, TIPO DE ÓRGÃO E SUAS INTERAÇÕES NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM *Notothenia rossii*.....126

TABELA 7- PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO BRANQUIAL DE *Notothenia rossii*.....126

TABELA 8- PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO RENAL DE *Notothenia rossii*.....126

TABELA 9- PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO HEPÁTICO DE *Notothenia rossii*.....128

TABELA 10- PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO ENCEFÁLICO DE *Notothenia rossii*.....128

TABELA 11 – PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DO TEMPO, TEMPERATURA, TIPO DE ÓRGÃO E SUAS INTERAÇÕES NO METABOLISMO DE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES EM *Notothenia rossii*.....129

LISTA DAS PRINCIPAIS SIGLAS¹

AMP	– adenosina monofosfato
ANOVA	– análise de variância
ATP	– adenosina trifosfato.
CAT	– catalase
CS	– citrato sintase
CTmax	– temperatura crítica máxima (do inglês <i>Critical thermal maximum</i>)
cm	– Centímetros
CO ₂	– Dióxido de carbono
CoA	– Coenzima A
CT	– comprimento total
CTmax	– Critical thermal maximum (temperatura crítica máxima)
DTNB	– 5'5-Ditiobis (2-nitrobenzoico ácido)
EACF	– Estação Antártica Comandante Ferraz
EDTA	– ácido etileno diamino tetracético (do inglês <i>Ethylenediaminetetracetic Acid</i>)
EPM	– erro padrão da média
EROs	– espécies reativas de oxigênio
g	– Aceleração da gravidade
g	– Gramas (unidade de massa)
G6Pase	– glicose-6-fosfatase
G6PDH	– glucose-6-fosfato desidrogenase
GP	– glicogênio fosforilase
GPx	– glutathione peroxidase
GR	– glutathione reductase
GSH	– glutathione reduzida
GSSG	– glutathione dissulfeto (glutathione oxidada)
GST	– glutathione-S-transferase
HCl	– ácido clorídrico
HK	– hexoquinase
LDH	– lactato desidrogenase
LPO	– peroxidação lipídica (do inglês <i>lipid peroxidation</i>)

¹ Siglas citadas apenas uma vez ou em sequência próxima no texto não estão listadas

MDA	– malondialdeído
MDH	– malato desidrogenase
m v ⁻¹	– proporção massa sobre volume
n	– Número de espécimes por experimento
NADH	– nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP	– nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADP ⁺	– nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada.
NADPH	– nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT	– azul de nitrotetrazólio
NKA	– sódio e potássio adenosina trifosfatase (Na ⁺ -K ⁺ -ATPase)
nm	– Nanômetro
PBS	– tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate buffer saline</i>)
PC	– carbonilação de proteínas (do inglês <i>protein carbonyl content</i> ou <i>protein carbonylation</i>)
PERMANOVA	– análise multivariada de variância permutacional
pH	– potencial Hidrogeniônico
PFK	– fosfofrutoquinase
Pi	– fosfato inorgânico
psu	– Unidade prática de salinidade
rpm	– rotações por minuto
SOD	– superóxido dismutase
TCA	– ciclo dos ácidos tricarbóxicos (do inglês <i>tricarboxylic acid cycle</i>)
U	– unidade internacional
UFPR	– Universidade Federal do Paraná
µg	– microgramas
µL	– Microlitro
µmol	– Micromol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	21
1.1 O continente antártico e suas características.....	21
1.2 Os nototenídeos e o estresse térmico	22
1.3 Estratégias frente ao estresse.....	24
CAPÍTULO I: Efeito do aumento gradual de temperatura nas respostas do metabolismo de carboidratos em peixes antárticos <i>Nothotenia rossii</i>	
.....	28
RESUMO	28
1 INTRODUÇÃO.....	29
2 OBJETIVOS	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Declaração de ética	33
3.2 Coleta e manutenção dos animais	33
3.3 Aumento gradual da temperatura	33
3.4 Métodos analíticos	34
3.4.1. Determinação dos níveis da atividade enzimática: metabolismo energético	34
3.4.2 Determinação dos Metabólitos Intermediários nos tecidos.....	35
3.5 Análise estatística	36
4 RESULTADOS	38
4.1 Análises de variância de enzimas do metabolismo de carboidratos.....	38
4.2 Análises de variância de metabólitos intermediários.....	39
4.3 Níveis de atividade de enzimas do metabolismo de carboidratos	41
4.4 Concentração de intermediários metabólicos.....	49
5 DISCUSSÃO.....	53
6 CONCLUSÃO	60
7 REFERÊNCIAS.....	60
CAPÍTULO II: Efeito do aumento gradual de temperatura sobre o sistema de defesa antioxidante e parâmetros metabólicos plasmáticos em peixes antárticos <i>Notothenia rossii</i>	
.....	68
RESUMO	68
1 INTRODUÇÃO.....	69

2 OBJETIVOS	69
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
3.1 Declaração de ética	73
3.2 Coleta e manutenção dos animais	73
3.3 Aumento gradual da temperatura	73
3.4 Métodos analíticos	74
3.4.1 Determinação dos níveis de atividade de enzimas antioxidantes e níveis de tióis não protéicos.....	74
3.4.2. Determinação dos níveis de marcadores de danos oxidativos.....	75
3.4.3 Determinação de cortisol plasmático.....	76
3.4.4 Determinação de parâmetros metabólicos do plasma.....	76
3.4.5 Determinação dos parâmetros osmo-iônicos do plasma.....	76
3.4.6 Determinação do parâmetro de osmorregulação branquial e renal.....	77
3.5 Análise estatística.....	77

4

RESULTADOS.....	788
4.1 Análises de variância de biomarcadores do metabolismo oxidativo, tióis protéicos e marcadores de danos oxidativos	78
3.2 Níveis de atividade de enzimas antioxidantes.....	81
3.3 Concentração dos níveis de marcadores de danos oxidativos e tióis não protéicos.....	83
3.4 Análises de variância de biomarcadores plasmáticos.....	91
3.5 Concentração do cortisol plasmático.....	92
3.6 Concentração de parâmetros metabólicos do plasma.....	93
3.7 Concentração de parâmetros osmo-iônicos do plasma.....	95
3.8 Análises de variância da Na ⁺ / K ⁺ ATPase e H ⁺ -ATPase nos tecidos renal e branquial.....	97
3.9 Níveis de atividade da Na ⁺ / K ⁺ ATPase e H ⁺ -ATPase branquial.....	98
3.10 Níveis de atividade da Na ⁺ / K ⁺ ATPase e H ⁺ -ATPase renal.....	99
5 DISCUSSÃO.....	101
6 CONCLUSÃO.....	108
REFERÊNCIAS.....	109

CAPÍTULO III: Análise integrada de biomarcadores do metabolismo de carboidratos e o sistema de defesa antioxidante, em peixes antárticos *N. rossii* frente ao aumento de

temperatura.....	117
RESUMO.....	1188
1 INTRODUÇÃO.....	118
2 OBJETIVOS.....	120
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	122
3.1 Declaração de ética.....	121
3.2 Coleta e manutenção dos animais.....	121
3.3 Aumento gradual da temperatura.....	121
3.4 Métodos analíticos.....	121
3.5 Análise estatística.....	121
4 RESULTADOS.....	123
4.1 Análise de variância do metabolismo de carboidratos.....	123
4.2 Análise de variância do metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes.....	126
5 DISCUSSÃO.....	130
6 CONCLUSÃO.....	134
7 REFERÊNCIAS.....	136
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	143
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	145

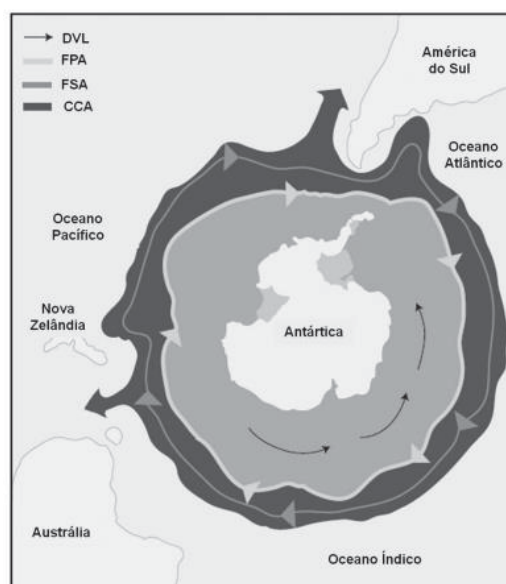
1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 O continente Antártico e suas características

O continente Antártico é isolado de todos os outros continentes pelo oceano Circum-Antártico e entre 50° e 60° S existe a barreira natural denominada Zona de Convergência Antártica responsável pelo alto grau de endemismo dos organismos antárticos (EASTMAN, 1993; CHENG *et al.*, 2003; GALLARDO, 2005; DUHAMEL *et al.*, 2014).

O oceano circum-Antártico é caracterizado por um sistema de correntes e frentes hidrográficas, as maiores e mais velozes correntes marítimas da Terra, entre elas a Corrente Circumpolar Antártica (CCA) (Figura 1) (FELICIO, 2007), que influencia diretamente a vida dos organismos polares que ali vivem (DEWITT, 1971; FOSTER, 1984; EKAU, 1991). A CCA apresenta importante papel ecológico pois realiza troca térmica na atmosfera e proporciona uma rica cadeia alimentar.

FIGURA 1 - O OCEANO ANTÁRTICO E O SISTEMA DE CORRENTES OCEÂNICAS QUE CIRCUNDAM O CONTINENTE.



FONTE: Adaptado de BEERS, JAYASUNDARA, 2015. LEGENDA: O oceano Antártico e o sistema de correntes oceânicas que circundam o continente. DVL-Deriva do vento leste; FPA-Frente Polar Antártica; FSA- Frente Sub-Antártica; CCA-Corrente Circumpolar Antártica.

Apesar de o continente apresentar condições climáticas extremas há registros de severas alterações em decorrência de mudanças climáticas. Registros na Península Antártica relatam aumento da temperatura das águas oceânicas (RENWICK, 2002; MEREDITH; KING, 2005; TURNER *et al.*, 2005; QIU, 2012; OLIVA *et al.*, 2017). Outras alterações como aumento da temperatura média do ar (CHAPMAN; WALSH, 2007), recuo de glaciares (COOK *et al.*, 2016), diminuição da camada de gelo (COMISO *et al.*, 2012) e desintegrações de plataformas de gelo (DE ANGELIS; SKVARCA, 2003) também foram relatadas.

Esses fatores têm o potencial de mudar os gradientes ecológicos ao longo da Península Antártica, alterando assim a estrutura e biodiversidade de suas águas (CONVEY *et al.*, 2009; BARNES *et al.*, 2018; GARCIA-PALACIOS *et al.*, 2018) e inclusive, a do solo antártico (ANDRIUZZI *et al.*, 2018).

1.2 Os nototenídeos e o estresse térmico

A fauna marinha Antártica é dominada por um grupo taxonômico altamente endêmico, os peixes nototenídeos (Nototenioidei). Esse grupo teve sucesso de sobrevivência na região por adquirir características, dentre outras, a capacidade de expressar glicoproteínas anticongelantes, evitando a formação de gelo intracelular (DEVRIES; CHENG, 2005) e também por perder características evolutivas como não apresentar resposta de choque térmico (HSR) (BUCKLEY *et al.*, 2004; PLACE *et al.*, 2004; HOFMANN *et al.*, 2005;) e a falta de expressão de hemoglobinas em espécies da família Channythyidae (DI PRISCO *et al.*, 2002)

Sabe-se que o aquecimento das águas oceânicas terá um impacto de longo alcance nos peixes marinhos, sobretudo naqueles extremamente estenotérmicos, tanto em sua fisiologia e comportamento quanto nas taxas de mortalidade, crescimento e reprodução (PÖRTNER; PECK, 2010). A variação de temperatura é, possivelmente, o fator abiótico que tem maior influência na distribuição biogeográfica dos organismos ectotérmicos (BASU *et al.*, 2002), pois limita as reações enzimáticas e afeta a estabilidade de macromoléculas a

dependência da intensidade e do tempo de exposição ao agente estressor (PECK *et al.*, 2004).

Estudos realizados com peixes antárticos indicaram menor tolerância aguda ao calor nestes organismos quando comparados a espécies de clima temperado (PODRABSKY; SOMERO, 2006) e têm demonstrado que estes são extremamente estenotérmicos (CLARK; LOWE *et al.*, 2005; CLARKE *et al.*, 2007; PECK, 2009; BILYK; DEVRIES, 2011), sendo consequentemente vulneráveis às alterações de clima e temperatura que podem ser impostas sobre o continente antártico (SOMERO *et al.*, 1998; PETRICORENA; PÖRTNER *et al.*, 2007; SOMERO, 2007; JAYASUNDARA *et al.*, 2013).

Em peixes antárticos, a tolerância térmica foi primeiramente estudada por Somero e DeVries (1967) que, ao submeterem nototenídeos a estresse térmico, com variação positiva de aproximadamente 4°C, verificaram perda de 30% na afinidade do oxigênio pelo pigmento sanguíneo. Jin e DeVries (2006) aclimataram *Pagothenia borchgrevinki*, coletados na região de McMurdo, à temperatura de 4°C durante 4 a 16 semanas e observaram que após 16 semanas os níveis de glicoproteínas anticongelantes (AFGPs) no plasma diminuíram.

Mais recentemente, Bilyk e DeVries (2011) determinaram a temperatura crítica máxima (CTMax) e sua plasticidade após aclimação a 4°C, em 11 espécies de peixes antárticos de regiões de altas e baixas latitudes. Estes autores observaram significativa diferença nas CTMaxs entre os peixes de baixas e altas latitudes e um aumento das CTMaxs, em todas as espécies testadas, após aclimação prévia a 4°C. A CTMax encontrada para *N. rossii* foi em torno de 16.2°C (SEEBACHER *et al.*, 2005; PODRABSKI e SOMERO, 2006; HUDSON *et al.*, 2008).

Lowe e Davison (2005) ao submeterem os nototenídeos *P. borchgrevinki* e *Trematomus bernacchii* a estresse térmico observaram lenta liberação de cortisol associada a hiperglicemia no plasma, e aumento do hematócrito em *P. Borchgrevinki*, devido ao aumento da temperatura.

O estresse térmico em fígado e músculo de *Pachycara brachycephalum* causou diminuição do conteúdo lipídico, redução de carboidratos e alteração nos níveis de proteínas nos dois tecidos (BRODTE *et al.*, 2008). Thorne *et al.*

(2010) expuseram o nototenídeo *Harpagifer antarcticus* a estresse térmico agudo (6°C por 48 h) e verificaram como resposta processos inflamatórios no tecido hepático.

Quanto a utilização de marcadores bioquímicos, Machado *et al.* (2014) demonstraram modulação negativa da atividade de GST no fígado de *N. rossii* quando exposto a 8 °C por 6 dias e que os níveis de GSH aumentaram ao longo do tempo expressivamente quando comparados ao grupo controle. Nessa mesma espécie foi observado aumento da atividade da citrato sintase (CS) e citocromo c oxidase (COX) no coração quando expostas a 12 °C e atividade diminuída em musculatura branca quando aclimatados a 7 °C (STROBEL *et al.*, 2013).

Estudos recentes abordaram biomarcadores plasmáticos, do metabolismo energético de carboidratos e do metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes de *N. rossii* em diferentes tecidos, no modelo de choque e estresse térmico agudo, quando há mudança abrupta de temperatura, demonstrando que essa espécie possui certa plasticidade frente ao estresse térmico (FORGATI *et al.*, 2017; KLEIN *et al.*, 2017; KANDALSKI *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018; PRZEPIURA *et al.*, 2019).

1.3 Estratégias frente ao estresse

Diante de uma agente estressor os organismos podem utilizar três diferentes estratégias. Podem usar sua faixa natural de tolerância fisiológica contando com sua capacidade de aclimação dentro de sua plasticidade fenotípica (Figura 2), desenvolver novas características e adaptações que permitam a sobrevivência ou migrar para lugares mais favoráveis (PECK, 2005).

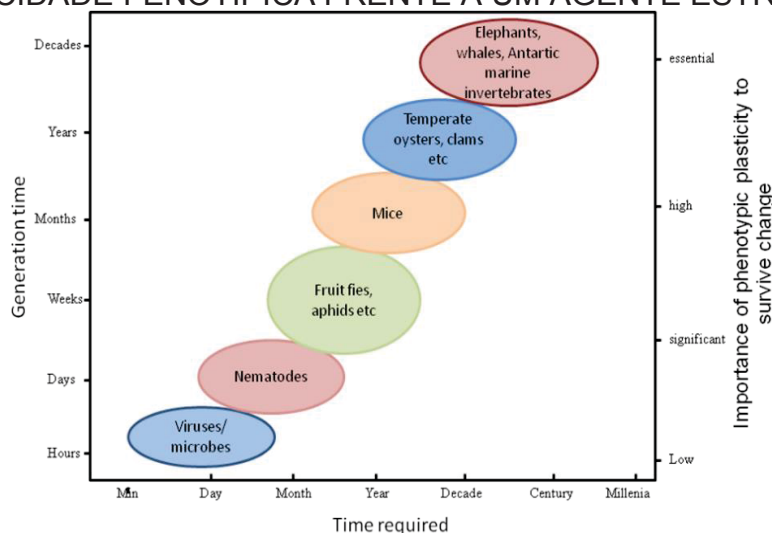
Para a fauna marinha Antártica, conhecida por apresentar capacidades fisiológicas limitadas, crescimento lento, alta longevidade, as habilidades para produzir novas adaptações frente às mudanças ambientais são pobres (PECK, 2005).

A capacidade de aclimação pode ser o componente que confere maior resistência à mudanças ambientais (SOMERO, 2010; PECK *et al.*, 2014), e quando submetidos à alterações de temperatura, os organismos, devem ser

capazes de restabelecer sua homeostase através de um conjunto complexo de respostas denominadas respostas ao estresse (BARTON, 2002; YAMASHITA *et al.*, 2010), que envolvem alterações nos níveis de metabólitos plasmáticos e teciduais.

A taxa de aquecimento também pode ter grande impacto nas respostas fisiológicas diante de um agente estressor. Se a taxa de mudança está além da flexibilidade fisiológica de uma espécie, ela perecerá. Se a taxa de mudança está dentro da plasticidade fenotípica inicial de uma espécie, mas continua por tempo persistente, a sobrevivência também será comprometida (PECK, 2011).

FIGURA 2 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MECANISMO DE PLASTICIDADE FENOTÍPICA FRENTE A UM AGENTE ESTRESSOR



FONTE: PECK, L.S. Marine Genomics, 2011

Frente ao estresse, podem-se observar dois tipos de resposta endócrina: a resposta via eixo hipotálamo-hipófise e células interrenais, onde há o aumento do cortisol plasmático, e a resposta adrenérgica, que resulta em aumento de catecolaminas plasmáticas (AFONSO *et al.*, 2008; PANKHURST, 2011), chamada de resposta primária.

A ação destes hormônios em diversos órgãos alvo desencadeia respostas secundárias ao estresse (BARTON, 2002), que podem causar alterações bioquímicas e metabólicas como, hiperglicemia, depleção das reservas teciduais de glicogênio, lipólise e inibição da síntese proteica (WENDELAAR BONGA, 1997; MOMMSEN *et al.*, 1999).

Quando a exposição ao agente estressor se torna crônica ocorre à resposta terciária que excede a capacidade de adaptação do organismo (estado de exaustão), levando a uma condição patológica ou morte (BARTON, 2002; OBA *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2009).

Observa-se também uma tendência a rápida mobilização das reservas energéticas, para que o organismo esteja apto a desenvolver respostas fisiológicas, celulares e comportamentais eficientes para lidar com as condições estressantes (BONGA, 1997). Essa mobilização energética é refletida pela hiperglicemia, depleção das reservas teciduais de glicogênio, lipólise e inibição da síntese proteica, após os organismos serem submetidos ao estresse (BONGA, 1997; MOMMSEN *et al.*, 1999). Dessa forma, diante do estresse térmico, a atividade de marcadores do metabolismo energético, a Na⁺/K⁺-ATPase e parâmetros plasmáticos podem ser influenciada.

O estresse térmico também promove alterações no transporte de elétrons da membrana mitocondrial interna, gerando dessa forma, espécies reativas ao oxigênio (EROs) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). As EROs podem vir a ser neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante. Entretanto, quando há o desequilíbrio entre este e a geração de EROs pode haver oxidação de biomoléculas e dano irreversível à célula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os mecanismos de aclimação parecem ser espécie específicos (BILYK; DEVRIES, 2011; ENZOR *et al.*, 2013.; STROBEL *et al.*, 2013). O tempo de resposta em diferentes órgãos e tecidos é igualmente variável e essas respostas dependem da intensidade do estresse e do tempo (PECK, 2011). Alguns estudos com aclimação prévia de peixes antárticos sugerem que tempos maiores associados às mudanças mais amenas de temperatura podem ser interessantes para a tolerância ao calor (BILYK; DEVRIES, 2011).

Podrabski e Somero (2006) observaram que dois nototenídeos *T. bernachii* e *Trematomus penelli* tem a habilidade de estender sua tolerância térmica quando aclimatados. Indivíduos que foram aclimatados a 4°C por quatro a seis semanas tiveram uma sobrevivência significativamente maior quando transferidos diretamente a 14°C, do que aqueles mantidos a sua temperatura ambiental normal.

Sandersfeld *et al.* (2015), demonstraram que em *T. bernacchii*, houve um aumento na taxa de rotina metabólica quando os animais foram expostos a um aumento agudo de temperatura a 4°C mas que após aclimação essa taxa retornou aos níveis semelhantes ao grupos controles mantidos a 0°C, concluindo que houve um perfeito ajustamento metabólico para essa espécie.

A espécie utilizada neste trabalho, *Nothotenia rossii* Richardson, 1844 (sinônimo *N. marmorata*) é endêmica da Antártica (GON; HEEMSTRA, 1990), abundante em biomassa na Baía do Almirantado e com importante papel na malha trófica da região (BARRERA-ORO, 2002; BARRERA-ORO; WINTER, 2008; RAGA *et al.*, 2015).

Assim, há grande interesse da comunidade científica em avaliar a capacidade adaptativa dos organismos antárticos, dentre eles os peixes, frente às variações de temperatura. Compreender os mecanismos fisiológicos e a plasticidade metabólica desses animais, pode fornecer subsídios que poderão contribuir para a tomada de decisão em relação aos ecossistemas e organismos sujeitos a possíveis alterações climáticas globais. Especialmente àqueles que habitam a Baía do Almirantado, Península Antártica.

Dessa forma, esta tese foi desenvolvida com o objetivo de avaliar os efeitos fisiológicos da elevação gradual de temperatura (0,5°C/dia) até que as temperaturas de 2,4,6 e 8°C fossem alcançadas em *N. rossii* em biomarcadores do seu metabolismo energético (capítulo I: “Efeito do aumento gradual de temperatura nas respostas do metabolismo de carboidratos em peixes antárticos *Nothotenia rossii*”) e de seu metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes bem como parâmetros plasmáticos (capítulo II: “Efeito do aumento gradual de temperatura sobre o sistema de defesa antioxidante e parâmetros metabólicos plasmáticos em peixes antárticos *Nothotenia rossii*”).

Neste estudo também se avaliou a influência dos fatores tempo, temperatura e tipo de órgão no metabolismo de carboidratos e sobre o sistema de defesa antioxidantes em situações de estresse (capítulo III: “Análise integrada de biomarcadores do metabolismo de carboidratos e o sistema de defesa antioxidante, em peixes antárticos *N. rossii* frente ao aumento de temperatura”).

CAPÍTULO I

Efeito do aumento gradual de temperatura em respostas do metabolismo energético de carboidratos no peixe antártico *Nothotenia rossii*

RESUMO

O aquecimento das águas do oceano Austral pode afetar os processos biológicos e o desempenho dos peixes que ali habitam. O grupo dos nothotenídeos é metabolicamente especializado em baixas temperaturas, podendo ser vulnerável às mudanças climáticas que são impostas ao continente Antártico. No entanto, mudanças graduais de temperatura permitem potencialmente uma oportunidade para ajustes de plasticidade. O presente trabalho verificou o efeito da temperatura de aclimação nos níveis de parâmetros enzimáticos e não enzimáticos do metabolismo energético de carboidratos nos tecidos renal, branquial, hepático e encefálico de *Nothotenia rossii*, submetidos à mudança gradual de temperatura de 0,5 °C / dia, até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem atingidas. Sob o efeito da taxa de aclimação de 0,5°C / dia o tecido branquial apresentou um aumento da atividade da fosfofrutoquinase (PFK). Nos rim houve aumento de atividade das enzimas malato desidrogenase (MDH), glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glicogênio fosforilase (GP). No fígado houve aumento na concentração de lactato e, no encéfalo aumento da atividade da GP. As respostas foram tecido específicas e indicam a presença de plasticidade térmica e tentativa de regulação do metabolismo energético para mitigar o estresse térmico em *N. rossii*, nessas condições experimentais, possivelmente pela ativação da glicólise, gliconeogênese e glicogenólise.

Palavras chave: *Nothotenia*, metabolismo, temperatura, Baía do Almirantado

Artigo referente ao presente capítulo:

GUILLEN, A.C.; BORGES, M.E.; HERRERIAS, T; KANDALSKI, P.K.; MARINS, E.A.; VIANA, D.; SOUZA, M.R.D.P.; DO CARMO DALOSKI, L; DONATTI, L. Effect of gradual temperature increase on the carbohydrate energy metabolism responses of the Antarctic fish *Nothotenia rossii* Submetido para publicação na revista **Marine Environmental Research** em 05 de junho de 2019

1 INTRODUÇÃO

O continente Antártico é formado por uma plataforma de gelo que corresponde a 70% da água doce do mundo e que cobre 99,6% do continente (CONVEY *et al.* 2009). Está isolado dos demais continentes pelo oceano Austral e entre 50° e 60° S existe a barreira natural denominada Zona de Convergência Antártica. Esta separa a Antártica dos outros oceanos e determina o alto grau de endemismo dos organismos antárticos (EASTMAN, 1993). O oceano Austral é caracterizado por um sistema de correntes e frentes hidrográficas, as maiores e mais velozes correntes marítimas da Terra, entre elas a Corrente Circumpolar Antártica (FLOWER; KENNETT, 1994) que influencia diretamente a vida dos organismos polares que ali vivem (EKAU, 1991).

Apesar do continente apresentar condições tão particulares e extremas, há registros de severas alterações em vários aspectos hidro geográficos em decorrência de mudanças climáticas. Registros da Península Antártica dos últimos 60 anos relatam que a temperatura das águas do oceano Antártico vem aumentando gradativamente, com o aquecimento estendendo-se até as águas superficiais, +1 °C na região próxima a Península Antártica (RENWICK, 2002; ; MEREDITH; KING, 2005; TURNER *et al.*, 2005; QIU, 2012; OLIVA *et al.*, 2016). Nesse mesmo período a temperatura média do ar aumentou em +1,6 °C (CHAPMAN; WALSH, 2007) e 87% dos glaciares da Península Antártica recuaram nos últimos 74 anos em decorrência do aquecimento de águas profundas e do ar atmosférico (COOK *et al.*, 2016).

Também houve diminuição da camada de gelo perene e de sua espessura, tornando o continente mais vulnerável (COMISO *et al.*, 2012). Desintegrações maciças de plataformas de gelo têm ocorrido nas últimas décadas (DE ANGELIS; SKVARCA, 2003) ou estão em iminência (JOUGHIN, 2014).

O aquecimento das águas oceânicas terá um impacto de longo alcance nos peixes marinhos, tanto em sua fisiologia e comportamento, quanto nas taxas de mortalidade, crescimento e reprodução (PÖRTNER; PECK, 2010). Além disso, a variação de temperatura, possivelmente é, o fator abiótico que tem maior influência na distribuição biogeográfica dos organismos ectotérmicos, pois

limita as reações enzimáticas e afeta a estabilidade de macromoléculas (BASU *et al.*, 2002).

A fauna marinha antártica é dominada por um grupo taxonômico altamente endêmico, os peixes nototenídeos (Nototeniioidei). Acredita-se que este grupo de teleósteos, evoluiu e especializou-se metabolicamente em temperaturas extremamente baixas e estáveis (BUCKLEY *et al.*, 2004; PLACE *et al.*, 2004; DEVRIES; CHENG, 2005; HOFMANN *et al.*, 2005), porém, podem ser vulneráveis às alterações de clima e temperatura que estão sendo impostas sobre o continente Antártico (PETRICORENA; SOMERO, 2007; PÖRTNER *et al.*, 2007; JAYASUNDARA *et al.*, 2013), uma vez que sua capacidade de aclimação, ou seja, diante de um agente estressor ser capaz de usar sua plasticidade fenotípica para retornar a um estado fisiológico estável, é limitada (PECK *et al.*, 2004).

Mudanças climáticas representam taxas de mudanças ambientais lentas ao longo de décadas e séculos na Antártica (RENWICK, 2002; MEREDITH; KING, 2005; TURNER *et al.*, 2005; QIU, 2012; OLIVA *et al.*, 2016). A plasticidade fenotípica e a presença de mecanismo homeostáticos eficientes são essenciais para garantir a sobrevivência diante de um evento estressor pelo tempo necessário até que uma adaptação seja efetiva (SOMERO, 2010; PECK, 2011).

Além disso, a aquisição de novas características adaptativas representa um processo longo para esses organismos que apresentam capacidades fisiológicas limitadas, crescimento lento e alta longevidade (PECK *et al.*, 2004). Numa escala de tempo, como as realizadas em condições experimentais, que variam de minutos a poucos meses, as respostas esperadas se darão em níveis bioquímicos, de expressão gênica, de plasticidade fenotípica e de respostas comportamentais. (PECK, 2011; MACHADO *et al.*, 2014; FORGATI *et al.*, 2017)

Entretanto, as alterações metabólicas ocorridas durante o processo de aclimação ainda não são plenamente conhecidas. Peck *et al.* (2009) demonstraram que indivíduos toleram maiores temperaturas máximas e mínimas quando as condições de temperatura mudam rapidamente, quando comparadas a mudanças mais graduais. No entanto, ao longo do tempo,

mudanças graduais de temperatura potencialmente permitem uma grande oportunidade para ajustes de plasticidade (ANGILLETTA, 2009). Dessa maneira, faz-se necessário investigar o impacto do aquecimento gradual de temperatura sobre o metabolismo energético dos peixes nototenídeos, e se esses animais são capazes de deflagrar mecanismos de ajuste que caracterizem plasticidade fenotípica nesses organismos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar as respostas fisiológicas na via do metabolismo energético de carboidratos do peixe antártico *Nothotenia rossii* submetido ao aumento gradual de temperatura.

2.2 ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar as variações na atividade de enzimas nas brânquias, rim, fígado e encéfalo relacionadas ao metabolismo energético de carboidratos, através de análises da atividade da hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH), lactato desidrogenase (LDH) e glicose-6-fosfatase (G6Pase), GP (glicogênio fosforilase) e G6PDH (glicose-6-fosfato-desidrogenase) em *N. rossii* submetidos ao aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia) até que se alcançassem as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C, 8 °C (9, 13, 17 e 21 dias).
- 2) Avaliar as variações na concentração dos metabólitos intermediários como o lactato, piruvato e glicogênio nas brânquias, rim, fígado e encéfalo de *N. rossii* submetidos ao aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia) até que se alcançassem as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C, 8 °C (9, 13, 17 e 21 dias).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Declaração de ética

Todo o trabalho foi executado de acordo com a ética e regras das leis brasileiras e do Tratado Antártico. O Ministério do Meio Ambiente concedeu a licença ambiental e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (CEUA - UFPR) sob o nº 496/2010 e 840/2015.

3.2 Coletas e manutenção dos animais

Na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, as coletas foram realizadas em *Punta Plaza* (PP - 62° 05' 64,5" S; 58° 24' 31.7" W) e *Arctowski*, em frente ao glaciar *Ecology* (62°10'.65" S; 58°26.5' W), locais de maior abundância de *N. rossii*. O método de captura foi linha e anzol, a uma profundidade de 10 a 25 metros com o auxílio de botes pneumáticos do tipo "Zodiac". Os peixes foram transportados dos locais de coleta para tanques de 1000 litros existentes no laboratório experimental da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) (62°05'0"S/58°23'28"W) e mantidos (n = 7 peixes por tanque) sob condições controladas de temperatura (0°C + 0.5), salinidade (35psu + 0.5), fotoperíodo (12 horas luz/ 12 horas escuro) e aeração constante por 5 dias (Donatti e Fanta, 2002). Os peixes foram marcados com linhas coloridas que possibilitavam a sua identificação e foram selecionados aleatoriamente para compor os grupos experimental e controle para os tempos 9,13,17 e 21 dias de experimento

3.3 Aumento gradual da temperatura

Exemplares de *N. rossii* (n =56; comprimento= 34 ± 3 cm, peso= 443 ± 134 g) foram submetidos a um aumento gradual da temperatura. No primeiro dia de experimento a temperatura da água nos tanques era de 0°C. A cada 24 horas, houve aumento de 0,5°C na temperatura da água, através de termostatos Aquaterm 09-01T-11457 (Full Cauge) acoplados a aquecedores (Altman) até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8°C fossem atingidas. Os peixes

foram então mantidos nas respectivas temperaturas durante 96 horas (4 dias), totalizando 9 (2°C), 13 (4°C), 17 (6°C) e 21 (8°C) dias de experimentos.

A cada dois dias os tanques foram limpos e 50% da água renovada, com temperatura controlada de acordo com o experimento. Os peixes foram alimentados individualmente (JAYASUNDARA *et al.* 2013; ALMROTH *et al.* 2015; RODRIGUES JR Jr *et al.* 2015), a cada 48h, com músculo epaxial de peixe (1% da sua massa corporal), alternando-se à troca de água dos tanques. Peixes que não se alimentavam foram excluídos dos experimentos. Para todos os grupos, o primeiro dia de experimento foi o primeiro dia da oferta de alimento. Os grupos experimentais e seus respectivos grupos controle foram alimentados nos mesmos horários (FORGATI *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018).

Para a eutanásia os peixes foram anestesiados com 20 mg.L⁻¹ de benzocaína 1%, (a partir de uma solução estoque de 0.1% (p.v⁻¹) em etanol a 95%) até cessarem as respostas à quaisquer estímulos (estágio 4, de acordo com Woody *et al.*, 2002). Após anestesia, os peixes foram eutanasiados com secção medular e imediatamente dissecados. Amostras de diferentes órgãos (brânquias, rins (médio posterior), fígado, encéfalo) foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -80°C. Para cada situação experimental, amostras de peixes mantidos a 0°C (n=7), considerados como controle, foram coletadas.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1. Determinação dos níveis da atividade enzimática: metabolismo energético de carboidratos

As análises espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplacas (EPOCH Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA).

As amostras de brânquias, rim, fígado e encéfalo foram pesadas e homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50Mm (pH 7,4) na proporção de 1:5 (pv⁻¹) com o auxílio do homogeneizador Potter-Elvehjem. Em seguida, o homogeneizado, em banho de gelo, foi sonificado durante 15 segundos para ruptura de estruturas subcelulares. O homogeneizado foi centrifugado a

14.000g a 4°C durante 10 min e o sobrenadante foi utilizado para as determinações das atividades enzimáticas a 20°C. Essa temperatura não desnatura proteínas e permite avaliação de cinética enzimática em pH ótimo e concentração de substrato, e tem sido usada em estudos anteriores com sucesso (JAYASUNDARA *et al.* 2013; RODRIGUES JR *et al.* 2015; FORGATI *et al.* 2017, SOUZA *et al.* 2018).

Os níveis de atividade enzimática foram expressos em nmol ou μmol de substrato convertido em produto por minuto ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$, mU; e $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$, U; respectivamente). As atividades específicas das enzimas foram expressas de acordo com a concentração de proteínas nas amostras ($\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ ou $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) após normalização para concentração de proteína de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), com soro bovino e albumina como padrão.

Os níveis de atividade da hexoquinase (HK, EC 2.7.1.1) foram determinados pelo método descrito por Baldwin *et al.* (2007) que quantifica a redução de NADP⁺ a 340nm. Os níveis de atividade da fosfofrutoquinase (PFK, EC 2.7.1.11) foram determinados pelo método descrito por Baldwin *et al.* (2007) mudanças na absorbância foram monitoradas continuamente a 340nm. Os níveis de atividade da citrato sintase (CS, EC 4.2.3.7) foram determinados pelo método descrito por Saborowski e Buchholz (2002), baseado na quantificação, a 410 nm, do complexo formado pela Coenzima A (CoA) e 5,5'-ditio-bis(ácido-2-nitrobenzóico)(DTNB)

Os níveis de atividade da malato desidrogenase (MDH, EC 1.1.1) foram determinados pelo método descrito por Childress e Somero (1979), onde a oxidação do NADH presente no meio de reação é quantificado a 340nm. Os níveis de atividade da lactato desidrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) foram determinados pelo método proposto por Thuesen *et al.* (2005), o decréscimo de absorbância foi observado a 340nm em decorrência da oxidação do NADH. Os níveis de atividade da glicose-6-fosfatase (G6Pase, EC 3.1.3.9) foram determinados pelo método proposto por Fathi *et al.* (2002) que consiste na quantificação do fosfato inorgânico produzido na reação. Os níveis de atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase a 600nm (G6PDH, EC 1.1.1.49) foram determinados a 340nm em decorrência da redução de NADP⁺ a NADPH pela

G6PDH (CIARDELLO *et al.*, 1995). Os níveis de atividade da glicogênio fosforilase (GP EC 2.4.1.1) foram determinados pela metodologia proposta por Chang *et al.* (2007) que acompanha a degradação do glicogênio pela GP a 340nm.

3.4.2 Determinação dos metabólitos intermediários nos tecidos

Para a quantificação do conteúdo de glicogênio, foi utilizada a técnica descrita por Dubois *et al.* (1956) e adaptada por Bidinoto *et al.* (1997). Após dissolução do tecido em KOH 6N em banho maria fervente por 3 minutos, seguida de adição de etanol e K₂SO₄ 10%, as amostras foram então, centrifugadas a 3.000 x g por 3 minutos, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo o precipitado em água destilada, seguido por adição de fenol 4.1%, H₂SO₄ concentrado. A concentração de glicogênio foi determinada após leitura a 480 nm, utilizando uma solução padrão de glicose a 1,0 mM. Os dados foram expressos como $\mu\text{moles de glicosil-glicose.g}^{-1}$ de tecido.

A concentração de lactato foi determinada segundo método descrito por Harrower e Brown (1972), baseado na formação de um complexo entre o lactato e o sulfato de cobre (CuSO₄), sendo o lactato revelado pelo p-fenilfenol e H₂SO₄ a 570 nm, utilizando solução padrão de ácido láctico 100nM. Os dados foram expressos em $\mu\text{mol de lactato.g}^{-1}$ de tecido.

O piruvato foi determinado segundo Lu (1939), após reação com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), a 440 nm, utilizando solução padrão de piruvato de sódio 100nM. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol de piruvato}^{-1}$ de tecido.

Os metabólitos intermediários foram analisados nas brânquias, fígado e rim de *N. rossii*. Análises no encéfalo não foram realizadas devido a insuficiência de material biológico.

3.5 Análises estatísticas

Primeiramente uma análise Univariada de Variância (ANOVA), foi aplicada à resposta dos diversos biomarcadores com distribuição paramétrica, para verificar diferença entre os grupos submetidos à variação de temperatura e tempo (ANDERSON, 2001). Para tanto, as unidades amostrais foram agrupadas em 2 fatores (fator tempo: 9, 13, 17 e 21 dias de experimento; fator

temperatura: controle (0°C) e experimental (2,4,6 e 8°C). Para os biomarcadores com distribuição não paramétrica foi aplicada a análise de Kruskal Wallis com agrupamento semelhante ao realizado para a ANOVA. Essas análises foram realizadas no pacote vega da plataforma R (DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013). Diferenças significativas foram consideradas quando $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

Todos os animais sobreviveram ao longo dos tempos de experimentos (9, 13, 17 ou 21 dias) e nas temperaturas testadas (0, 2, 4, 6 e 8°C). As análises de variância mostraram que entre os biomarcadores testados, alguns apresentaram diferenças significativas quando influenciados pelos fatores temperatura ou tempo, bem como, pela interação entre os dois fatores (Tabela 1).

4.1 Análises de variância de enzimas do metabolismo de carboidratos

Nas brânquias de *N. rossii* os biomarcadores enzimáticos GP ($F=21.41$, $p=1.0^{-4}$), LDH ($F=14.96$, $p=0.0018$), MDH ($F=16.91$, $p=7.0^{-4}$) e G6PDH ($F=22.68$, $p=0$) foram alterados pelo tempo enquanto que a temperatura alterou somente a PFK ($F=3.99$, $p=0.04$) (Tabela 1). A interação do tempo e temperatura, não influenciou, nenhum biomarcador analisado (Tabela 1).

No encéfalo de *N. rossii*, à exceção da G6Pase, todos os biomarcadores enzimáticos analisados, foram alterados pelo tempo. Já a temperatura não influenciou os biomarcadores analisados, no entanto, a interação tempo e temperatura influenciaram os biomarcadores enzimáticos GP ($F=8.83$, $p=0.031$), LDH ($F=21.65$, $p=1.0^{-4}$) e G6Pase ($F=9.83$, $p=0.02$).

No fígado de *N. rossii* os biomarcadores CS ($F=10.66$, $p=0.01$), GP ($F=26.33$, $p=0$), LDH ($F=12.32$, $p=0.0063$), G6Pase ($F=11.76$, $p=0.0082$) e G6PDH ($F=18.9$, $p=0$) foram alterados pelo tempo, enquanto que a temperatura alterou somente G6PDH ($F=7.12$, $p=0.01$). Os biomarcadores LDH ($F=8.84$, $p=0.031$) e G6Pase ($F=11.73$, $p=0.0083$) foram alterados pela interação entre tempo e temperatura

No rim de *N. rossii* os biomarcadores CS ($F=26.63$, $p=0$), GP ($F=19.74$, $p=2.0^{-4}$), HK ($F=38.82$, $p=0$), LDH ($F=30.52$, $p=0$), MDH ($F=21.73$, $p=1.0^{-4}$) e PFK ($F=28.5$, $p=0$) foram alterados pelo tempo. A temperatura não alterou nenhum biomarcador analisado enquanto que a interação entre tempo e temperatura alterou a GP ($F=8.83$, $p=0.0316$), MDH ($F=22.92$, $p=0$) e G6PDH ($F=13.53$, $p=0.004$).

4.2 Análises de variância de metabólitos intermediários

Nas brânquias de *N. rossii* o tempo alterou a concentração de lactato ($F=13.84$, $p=0.0031$) e piruvato ($F=10.27$, $p=0.0164$) enquanto a temperatura isoladamente e sua interação com o tempo não alteraram nenhum dos metabólitos intermediários.

No fígado de *N. rossii*, as concentrações de lactato ($F=18.906$, $p=3.0^{-4}$), piruvato ($F=3.423$, $p=0.024$) e glicogênio ($F=12.95$, $p=0.004$) foram influenciadas pelo tempo. A concentração de piruvato ($F=7.36$, $p=0.009$) foi influenciada pela temperatura e o lactato ($F=9.44$, $p=0.023$) pela interação entre o tempo e a temperatura.

No rim de *N. rossii*, o piruvato ($F=17.94$, $p=5.0^{-4}$) foi influenciado pelo tempo e a temperatura influenciou a concentração de glicogênio ($F=3.92$, $p=0.047$). A interação entre tempo e temperatura não influenciou nenhum metabólico intermediário.

TABELA 2 – RESULTADOS DAS ANÁLISES UNIVARIADAS DOS BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM *Nothotenia rossii*

	CS		GP		HK		LDH		MDH		PFK		G6Pase		G6PDH		LACTATO		PIRUVATO		GLICOGÊNIO	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
BRÂNQUIAS	0,002	0,966	0,008	0,93	0,084	0,772	0,987	0,3204	0,0191	0,89	3,9995	0,045*	-	-	0,057	0,811	0,1723	0,6781	0,0191	0,89	2,7149	0,0994
	2,443	0,081	21,415	1,0E-04*	7,5	0,057	14,97	0,0018*	16,912	7,0 E-04*	5,2288	0,156	-	-	22,68	0*	13,847	0,003*	10,275	0,0164*	7,572	0,0557
	0,065	0,978	1,512	0,679	2,52	0,472	2,638	0,4508	2,699	0,440	3,8098	0,283	-	-	0,567	0,904	3,5375	0,316	4,0691	0,2541	6,2077	0,1019
ENCFALO	1,633	0,201	1,634	0,201	0,060	0,805	2,535	0,1113	1,877	0,170	0,9601	0,327	0,004	0,946	0*	1	-	-	-	-	-	-
	24,802	0*	19,749	2,0E-04*	38,82	0*	13,173	0,0043*	24,005	0*	30,641	0*	4,345	0,226	11,95	0,009*	-	-	-	-	-	-
	7,691	0,053	8,836	0,032*	2,848	0,415	21,650	1,0E-04*	7,0022	0,071	6,910	0,075	9,833	0,02*	2,874	0,411	-	-	-	-	-	-
FÍGADO	0,386	0,534	0,318	0,573	0,903	0,341	0,002	0,9608	0,1815	0,670	2,0325	0,154	0,435	0,510	7,12	0,01*	0,6984	0,698	7,3685	0,0092*	0,0696	0,7919
	10,66	0,014*	26,336	0*	6,163	0,104	12,327	0,006*	3,3271	0,343	7,8126	0,05	11,763	0,008*	18,31	0*	18,906	3,0E-04*	3,4231	0,0244*	12,959	0,0047*
	0,373	0,946	0,292	0,961	6,207	0,102	8,840	0,031*	4,5997	0,208	2,3945	0,495	11,735	0,008*	0,35	0,789	9,4471	0,024*	2,2625	0,0931	3,3575	0,3397
RIM	0,0912	0,7627	1,6337	0,2012	0,0604	0,805	0,0431	0,8356	0,0602	0,806	0,049	0,824	0,071	0,789	1,201	0,273	3,6544	0,056	0,3576	0,5499	3,9297	0,0474*
	26,637	0*	19,748	2,00E-04*	38,826	0*	30,521	0*	21,73	1E-04*	28,509	0*	4,966	0,174	3,617	0,306	5,4109	0,144	17,944	5,00E-04*	0,9603	0,8108
	0,2681	0,9659	8,8357	0,031*	2,8477	0,416	0,1884	0,9794	22,927	0*	0,633	0,729	5,763	0,124	13,53	0,004*	2,9474	0,4	1,1824	0,7572	13,352	0,0039

LEGENDA: Efeitos do aumento gradual de temperatura (05 °C/dia até alcançar as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C e 8 °C), tempo (T9, T13, T17, T21) e sua interação nas respostas de biomarcadores do metabolismo energético em *N. rossii*, CS -Citrato sintase; GP- Glicogênio fosforilase; HK- Hexoquinase; LDH- Lactato desidrogenase; MDH – Malato desidrogenase; PFK – Fosfofrutoquinase; G6Pase – Glicose-6-Fosfatase; G6PDH- Glicose-6-fosfato-desidrogenase,; lactato; piruvato e glicogênio, nos tecidos branquial, encefálico, hepático e renal de *N. rossii*. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$.

4.3 Níveis de atividade de enzimas do metabolismo de carboidratos

Nas brânquias de *N. rossii*, não houve alteração nos níveis de atividade das enzimas CS (Fig. 1g) e HK (Figura 1b) quando comparadas com seus respectivos grupos controle e entre os diferentes tempos experimentais. Os níveis de atividade da GP (Fig. 2f) e MDH (Figura 1d) aumentaram nos grupos controle e experimental a 9 dias (0 °C e 2 °C, respectivamente), quando comparado aos demais grupos controle (0 °C) e experimentais em 13, 17 e 21 dias (4 °C, 6 °C, 8 °C). No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos controle e experimental. Os níveis de atividade da PFK (Figura 1e) nas brânquias de *N. rossii* aumentaram significativamente em todas as temperaturas atingidas (2, 4, 6 e 8 °C), após 9, 13, 17 e 21 dias de aclimação, quando comparadas ao respectivo controle (0 °C). Os níveis de atividade da enzima G6PDH (Figura 2a) aumentaram nos grupos controle (0 °C) e experimental (8 °C) em 21 dias, quando comparado aos demais grupos controle (0 °C) e experimentais em 9, 13 e 17 dias (2 °C, 4 °C, 6 °C). No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos controle e experimental.

Nos rins de *N. rossii* os níveis de atividade da CS (Figura 2g) foram maiores em 9 e 21 dias nos grupos controle (0 °C) e experimental (2 °C e 8 °C, respectivamente), quando comparados com os grupos controle (0 °C) e experimental em 13 e 17 dias (4 °C, 6 °C, respectivamente) porém, não houve diferença significativa entre os grupos controle e experimental. Os níveis de LDH (Figura 2c) aumentaram no grupo controle (0 °C) e experimental (8 °C), em 21 dias, quando comparamos aos demais tempos experimentais 9, 13 e 17 dias (2 °C, 4 °C e 6 °C). No entanto, não houve variação significativa entre os grupos experimentais e controle.

Não houve alteração nos níveis de atividade da G6Pase renal (Figura 2h) quando comparamos cada situação experimental com seus respectivos controles e entre os diferentes tempos experimentais. A HK (Figura 2b) aumentou seus níveis de atividade nos grupos controle e experimental em 9 dias, quando comparada aos demais grupos, controle (0 °C) e experimentais (4, 6 e 8 °C). Nos grupos experimental (4 °C) e controle (0 °C) em 13 dias, os níveis de HK também foram maiores quando comparados aos grupos experimental (6 °C) e controle (0 °C) aos 17 dias (Figura 2b). Não houve

variação significativa dos níveis de atividade da HK renal, quando comparamos grupos experimentais com seus respectivos grupos controle (Figura 2b).

Os níveis de atividade da PFK foram maiores nos grupos controle (0 °C) e experimental (2 °C) em 9 dias, quando comparados com as situações controle (0 °C) e experimental em 17 e 21 dias (6 °C e 8 °C, respectivamente) (Figura 2e). Os níveis de atividade da MDH aumentaram quando atingida a temperatura de 2°C, após 9 dias de aclimação, quando comparada ao seu grupo controle (0 °C) e aos demais tempos experimentais em 13, 17 e 21 dias (4 °C, 6 °C e 8 °C) (Figura 2d). Já em 21 dias a atividade da MDH no grupo controle (0°C) aumentou quando comparada ao seu respectivo grupo experimental e aos grupos controle (0 °C) e experimentais em 13 e 17 dias (4 °C e 6 °C) bem como no grupo controle (0 °C) em 9 dias (Figura 2d). Os níveis de atividade da MDH no grupo experimental em 13 dias (4 °C) aumentaram quando comparados com os grupos controle (0 °C) e experimental em 17 dias (6 °C) (Figura 2d). Observou-se ainda um aumento nos níveis de atividade da GP a 6 °C, após 17 dias de aclimação, quando comparada a seu grupo controle e com as situações controle (0 °C) e experimentais (4 °C e 8 °C) em 13 e 21 dias (Figura 2f). Os níveis de atividade da G6PDH aumentaram em 2 °C, 9 dias, quando comparada ao seu respectivo controle e quando comparado com o grupo controle (0 °C) em 21 dias (Figura 3a).

No fígado de *N. rossii* a atividade da CS aumentou nos grupos controle (0°C) e experimental (8 °C) aos 21 dias, quando comparamos os grupos controle (0 °C) e experimental em 9 e 17 dias (2 °C e 6 °C) (Figura 2g) mas não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (2, 4, 6 e 8 °C) e seus respectivos controles. A G6Pase (Figura 3h) aumentou seu nível de atividade a 0 °C em 21 dias quando comparado aos grupos controle (0 °C) e experimental (2 °C e 4 °C) em 9 e 13 dias, e ao grupo experimental em 17 dias (6 °C). A GP hepática também aumentou seus níveis de atividade nos grupos controle (0°C) e experimental (8 °C) em 21 dias quando comparamos aos demais grupos controle e experimental (9, 13 e 17 dias) em todas as demais temperaturas alcançadas (2 °C, 4 °C e 6 °C) (Figura 3f).

Os níveis de atividade da G6PDH hepática foram maiores nos grupos controle (0°C) e experimental (2 °C) em 9 dias, quando comparados aos níveis

do grupo controle (0 °C) e experimental em 17 dias e 21 dias (6 e 8 °C). Já os níveis de atividade do grupo controle (0°C) e experimental (8 °C) em 21 dias foram menores quando comparado aos demais grupos controle e experimental (9,13 e 17 dias). Não houve diferença significativa da G6PDH hepática entre grupo qualquer grupo experimental e seu respectivo controle (Fig 3a).

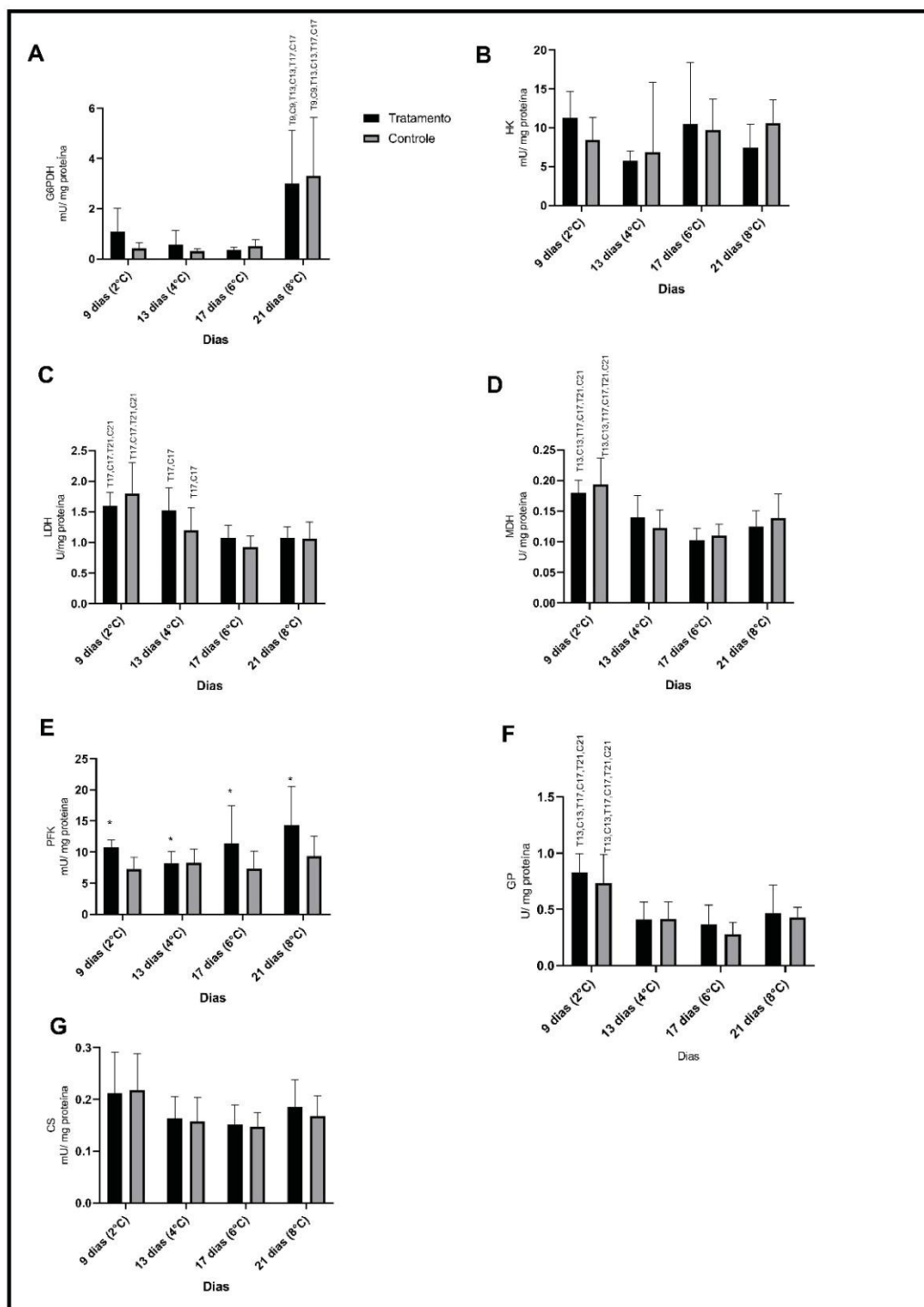
Não houve alteração nos níveis de atividade da HK (Figura 3b), LDH (Figura 3c), MDH (Figura 3d) e PFK (Figura 3e) hepática, quando comparadas com seus respectivos controles e entre os diferentes tempos experimentais.

No encéfalo de *N. rossii* os níveis de atividade da HK aumentaram nos grupos controle (0°C) e experimental (2°C) em 9 dias, quando comparados aos demais controles (13, 17 e 12 dias), também a 0°C e aos demais grupos experimentais (4°C,6°C,8°C). Em 13 dias, os níveis de atividade do grupo controle (0°C) e experimental (4°C) da HK aumentaram quando comparado ao grupo controle (0°C) e experimental (6°C) em 17 dias. Não houve diferença significativa da HK encefálica entre grupo experimental e seu respectivo controle (Figura 4b).

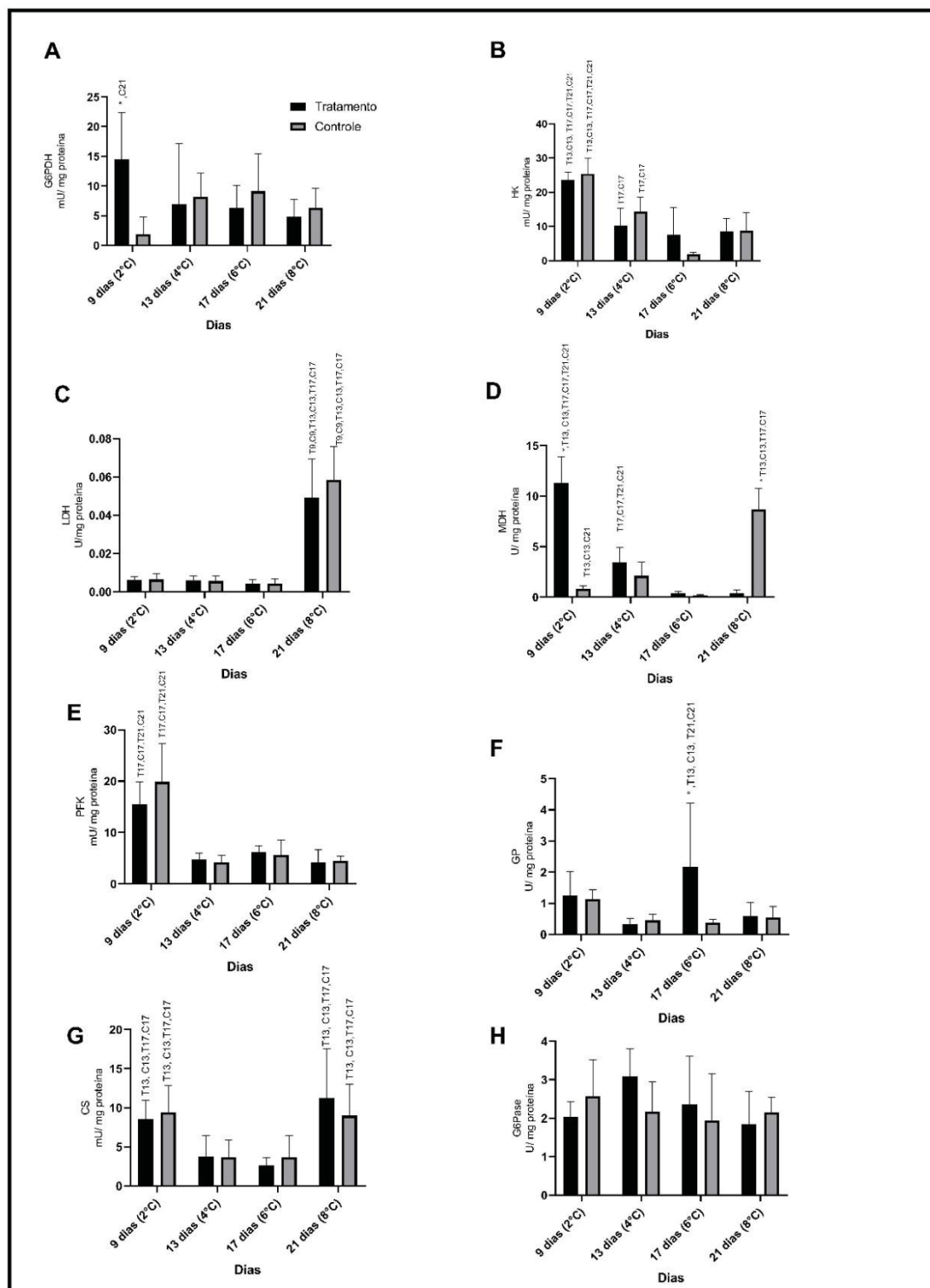
A atividade da LDH encefálica aumentou a 0°C em 21 dias quando comparada ao seu grupo experimental e com os demais grupos, controle e experimental em todas as temperaturas alcançadas (2°C,4°C e 6°C) (Figura 4c). A atividade da PFK aumentou nos grupos controle (0°C) e experimental (2°C) em 9 dias quando comparada aos demais grupos, controle (0°C) e experimental nas demais temperaturas alcançadas (4°C, 6°C,8°C). Também houve aumento da atividade dessa enzima em 13 dias nos grupos controle (0°C) e experimental (4°C) quando comparada também ao grupo controle (0°C) e experimental (8°C) em 21 dias. Não houve diferença significativa da LDH encefálica entre quaisquer grupos experimentais e seus respectivos controles (Figura 4e).

Não houve alteração nos níveis de atividade da CS (Figura 4g) e G6Pase (Figura 5h) encefálica quando comparamos situação experimental com seus respectivos controles e entre os diferentes tempos experimentais. Os níveis de atividade da MDH aumentaram nos grupos controle (0°C) e experimental (2°C) em 9 dias, quando comparados aos grupos controle (0°C) e experimental (4°C) em 13 dias (Figura 5d). Houve aumento dos níveis de

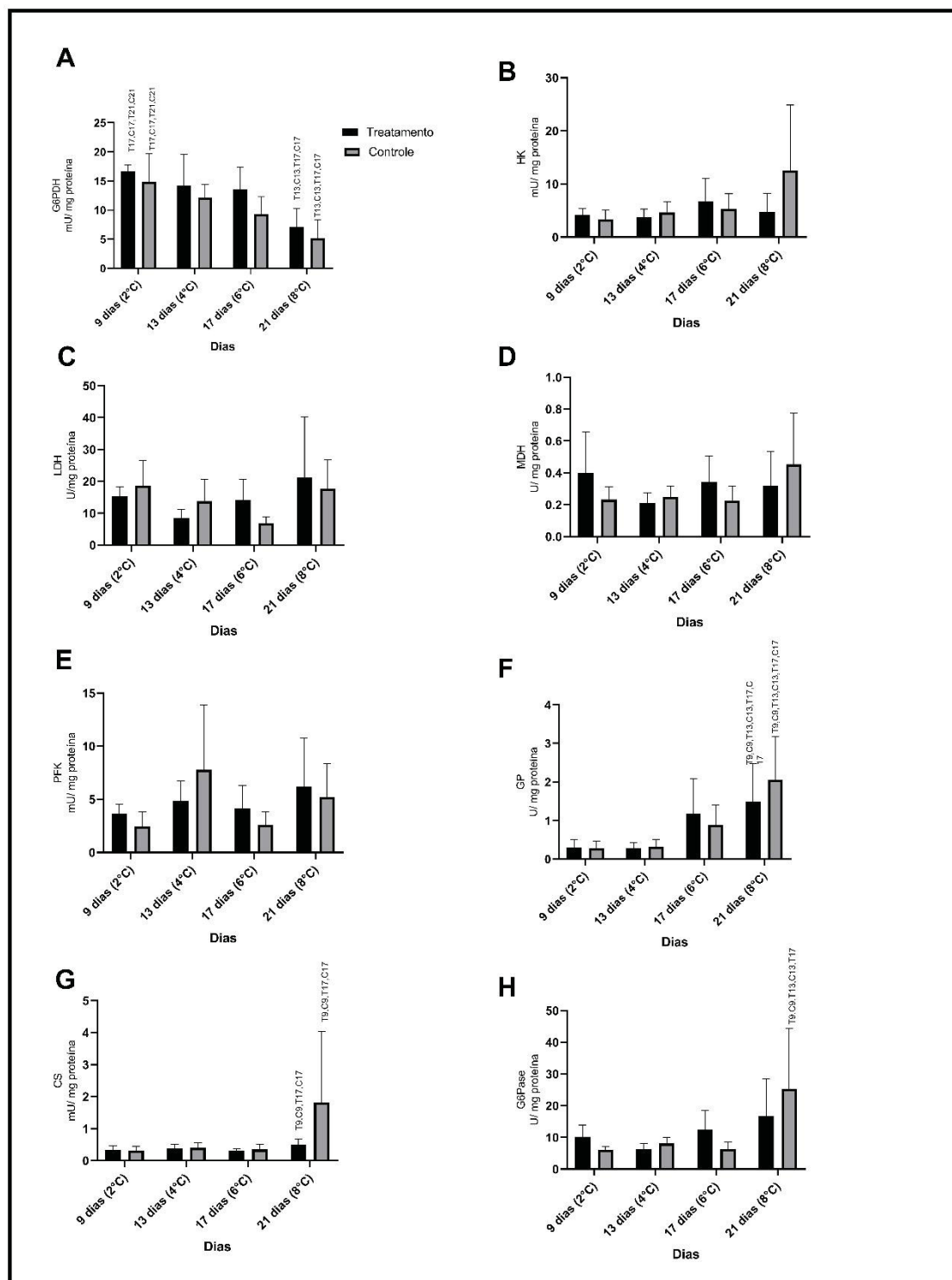
atividade da GP a 6 °C, em 17 dias, quando comparado ao seu controle e aos demais grupos controle (0°C) e experimentais em 13 e 21 dias (4°C e 8°C, respectivamente) (Figura 4f). Os níveis de atividade da G6PDH encefálica diminuíram nos grupos controle (0°C) e experimental (4°C) em 13 dias quando comparado aos grupos controle e experimental em 17 dias (6°C). Porém, não houve diferença significativa da G6PDH encefálica entre quaisquer grupos experimentais e seus respectivos grupos controles (Figura 4a).

FIGURA 1 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO BRANQUIAL DE *Nothotenia rossii*

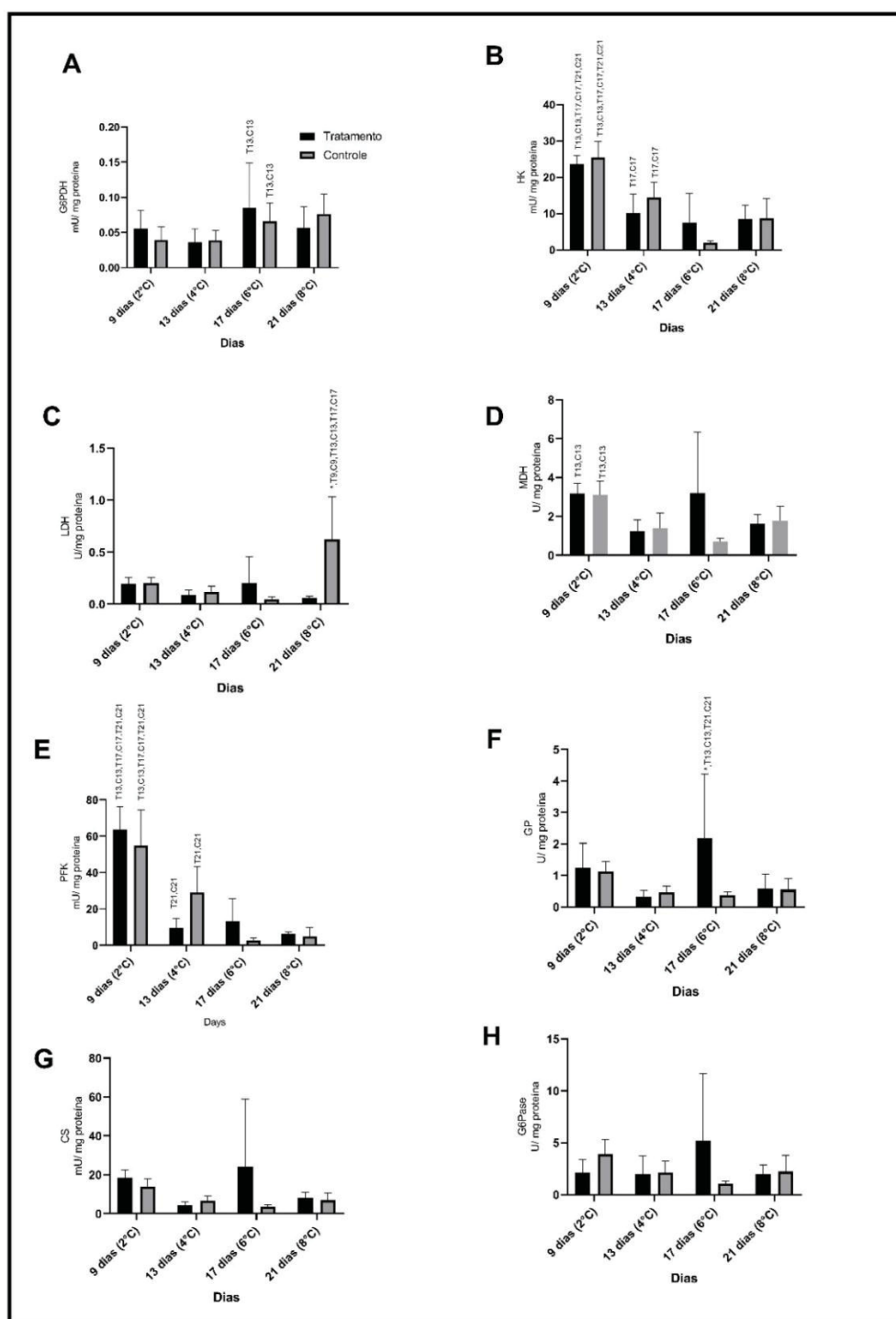
LEGENDA: *N. rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem alcançadas. Glicose-6-fosfato-desidrogenase, G6PDH; Hexoquinase, HK; Lactato desidrogenase, LDH; Malato desidrogenase, MDH; Fosfofrutoquinase, PFK; Glicogênio fosforilase, GP; Citrato sintase, CS. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. **C=controle T=tratamento

FIGURA 2 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO RENAL DE *Nothotenia rossii*

LEGENDA: *N.rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2,4,6 e 8 °C fossem alcançadas. Glicose-6-fosfato-desidrogenase, G6PDH; Hexoquinase, HK; Lactato desidrogenase, LDH; Malato desidrogenase, MDH; Fosfofrutoquinase, PFK; Glicogênio fosforilase, GP; Citrato sintase, CS; Glicose-6-fosfatase, G6Pase. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. ** C=controle T=tratamento

FIGURA 3 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO HEPÁTICO DE *Nothotenia rossii*

LEGENDA: *N.rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2,4,6 e 8 °C fossem alcançadas. Glicose-6-fosfato-desidrogenase, G6PDH; Hexoquinase, HK; Lactato desidrogenase, LDH; Malato desidrogenase, MDH; Fosfofrutoquinase, PFK; Glicogênio fosforilase, GP; Citrato sintase, CS; Glicose-6-fosfatase, G6Pase. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. ** C=controle T=tratamento

FIGURA 4 – NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO ENCEFÁLICO DE *Nothotenia rossii*

LEGENDA: *N.rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2,4,6 e 8 °C fossem alcançadas. Glicose-6-fosfato-desidrogenase, G6PDH; Hexoquinase, HK; Lactato desidrogenase, LDH; Malato desidrogenase, MDH; Fosfofrutoquinase, PFK; Glicogênio fosforilase, GP; Citrato sintase, CS; Glicose-6-fosfatase, G6Pase. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. ** C=controle T=tratamento

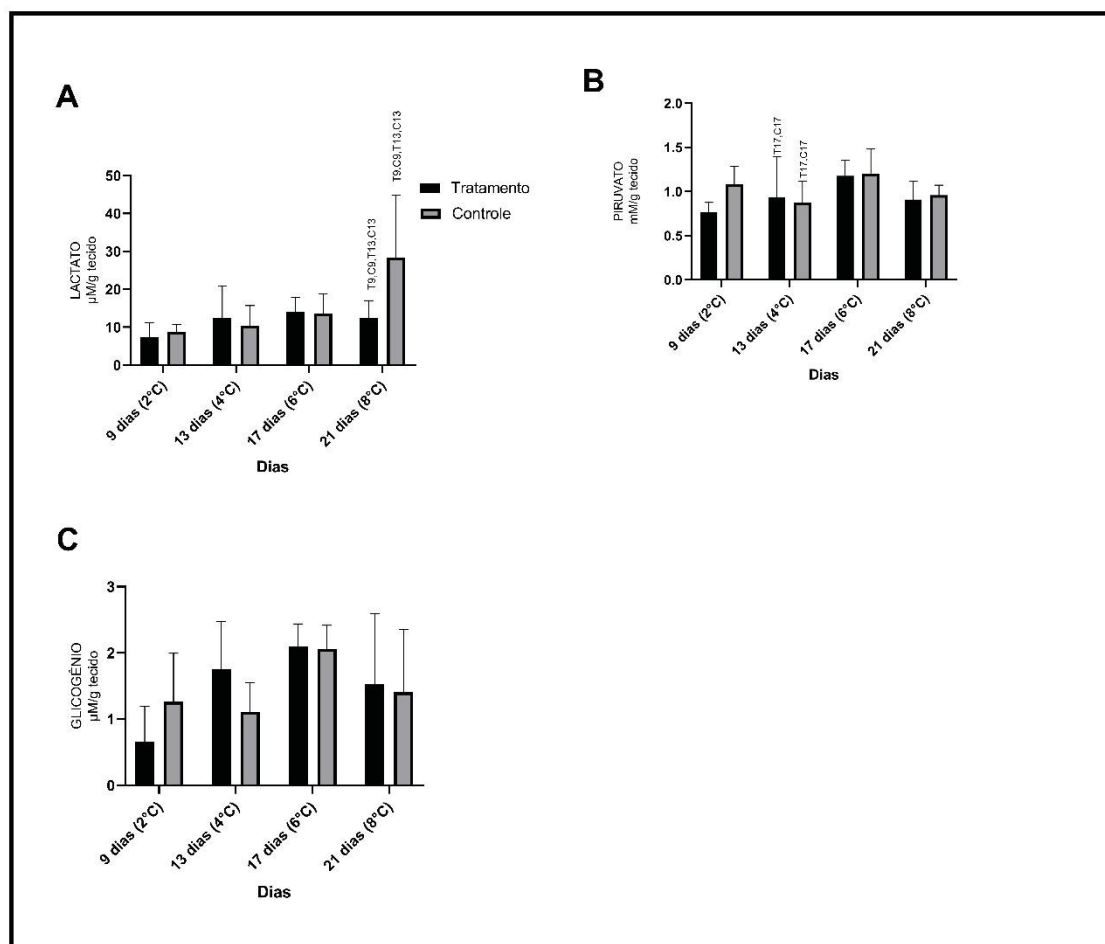
4.4 Concentração de metabólitos intermediários

Nas brânquias de *N. rossii* não houve alteração na concentração de glicogênio quando comparamos situação experimental com seus respectivos controles e entre os tempos experimentais (Figura 5c). A concentração de lactato (Figura 5b), aumentou no grupo controle, com 21 dias, quando comparada aos grupos controle (0°C) e experimentais em 9 e 13 dias (2°C e 4°C, respectivamente) e a de piruvato (Figura 5a) aumentou em nos grupos controle (0°C) e experimental (6°C), em 17 dias, quando comparada ao grupo controle (0°C) e experimental (6°C) em 13 dias. Não houve diferença significativa na concentração de lactato e de piruvato entre grupo experimental e seu respectivo controle.

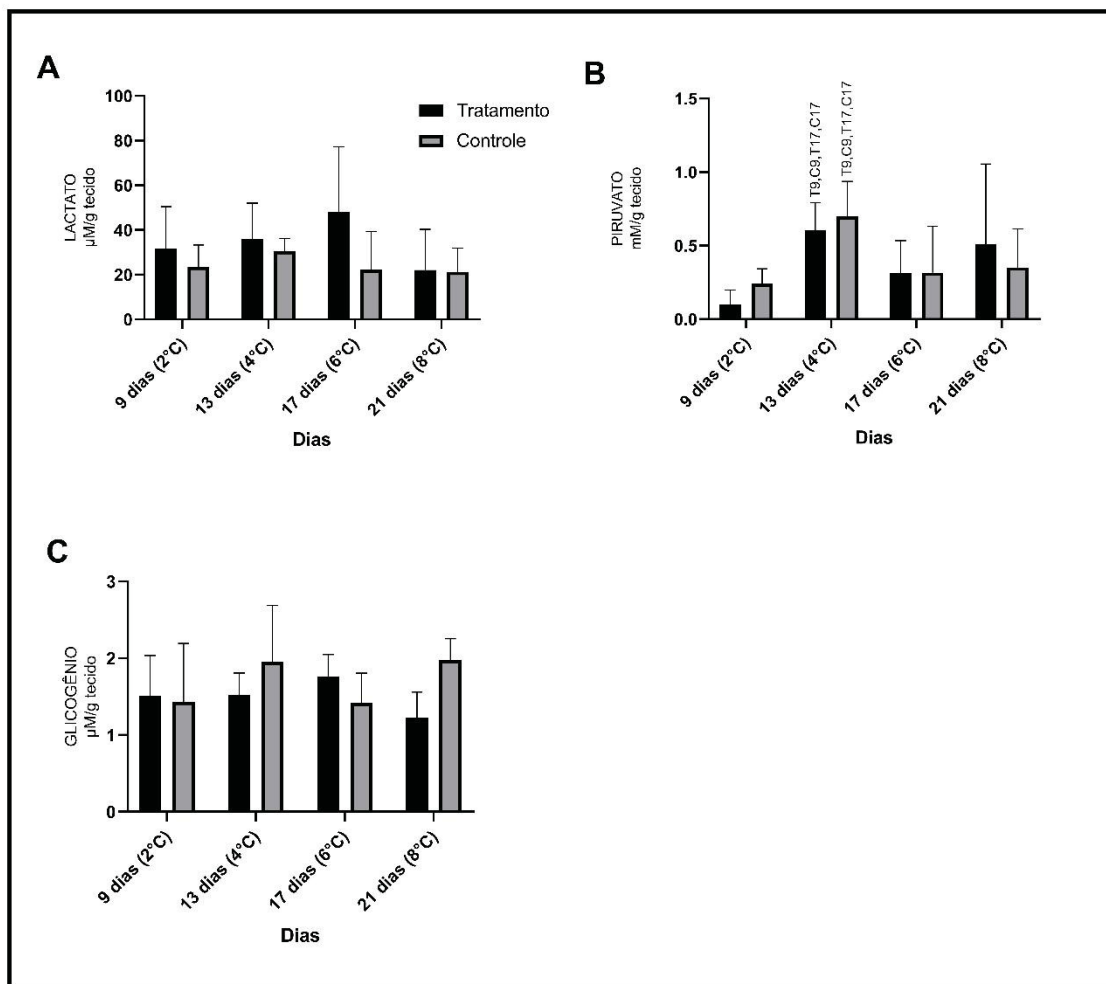
No rim de *N. rossii* não se observou alteração na concentração de glicogênio (Figura 6c) e de lactato (Figura 6a) quando comparamos situação experimental com seus respectivos controles e entre os diferentes tempos experimentais. Já a concentração de piruvato aumentou nos grupos controle (0°C) e experimental (4°C), em 13 dias, quando comparado aos grupos controle (0°C) e experimentais em 9 e 17 dias (2°C e 6°C respectivamente) (Figura 6b).

No fígado de *N. rossii* a concentração de glicogênio aumentou a 6°C, em 17 dias, quando comparado aos grupos controles (0°C) e experimentais (2°C e 4°C) em 9 e 13 dias, porém não houve diferença entre grupo experimental e seu respectivo controle (Figura 7c). Não se observou alteração na concentração de piruvato (Figura 7b) quando comparamos situação experimental com seus respectivos controles e entre os diferentes tempos experimentais.

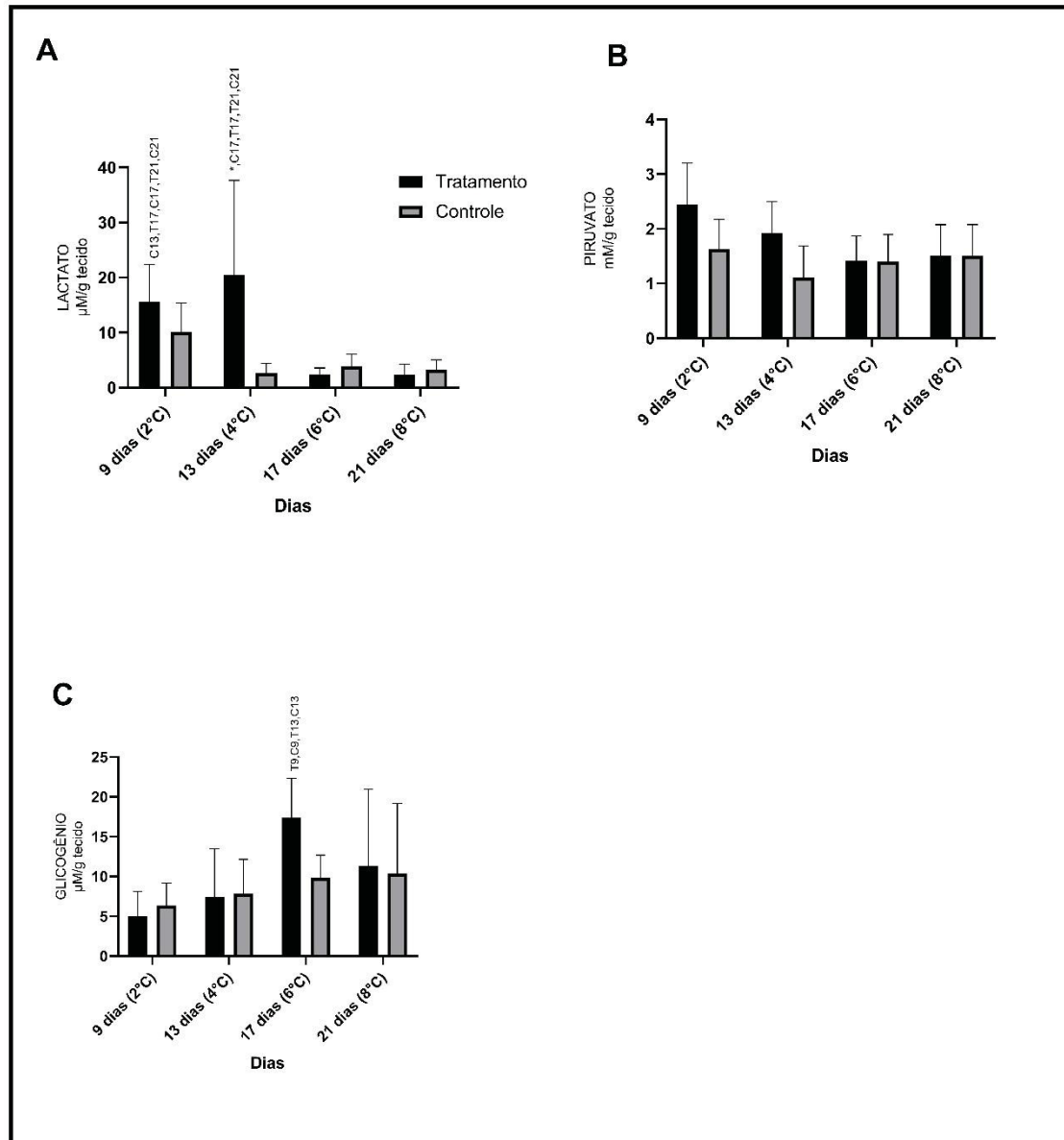
A concentração de lactato hepático aumentou em 2°C, 9 dias, quando comparado aos demais grupos experimentais (13, 17 e 21 dias) e em relação ao grupo controle (0°C) em 13 dias (Figura 7a). A concentração de lactato, com 13 dias de exposição e 6°C aumentou quando comparado com seu respectivo controle e com os grupos experimentais (6°C e 8°C) e controle (0°C) em 17 e 21 dias (Figura 7a).

FIGURA 5- CONCENTRAÇÃO DE METABÓLICOS INTERMEDIÁRIOS NO TECIDO BRANQUIAL EM *Nothotenia rossii*

LEGENDA: *N. rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura ($0,5^{\circ}\text{C}/\text{dia}$), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8°C fossem alcançadas. Glicogênio, lactato e piruvato. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. ** C=controle T=tratamento

FIGURA 6- CONCENTRAÇÃO DE METABÓLICOS INTERMEDIÁRIOS NO TECIDO RENAL EM *Nothotenia rossii*

LEGENDA: *N. rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem alcançadas. Glicogênio, lactato e piruvato. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. ** C=controle T=tratamento

FIGURA 7- CONCENTRAÇÃO DE METABÓLICOS INTERMEDIÁRIOS NO TECIDO HEPÁTICO EM *Nothotenia rossii*

LEGENDA: *N. rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem alcançadas. Glicogênio, lactato e piruvato. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. ** C=controle T=tratamento

5 DISCUSSÃO

Os efeitos promovidos pelo estresse térmico são afetados pelo tempo de exposição do agente estressor, sua magnitude e frequência, bem como, por fatores genéticos (BARTON *et al.*, 2002, PECK, 2011).

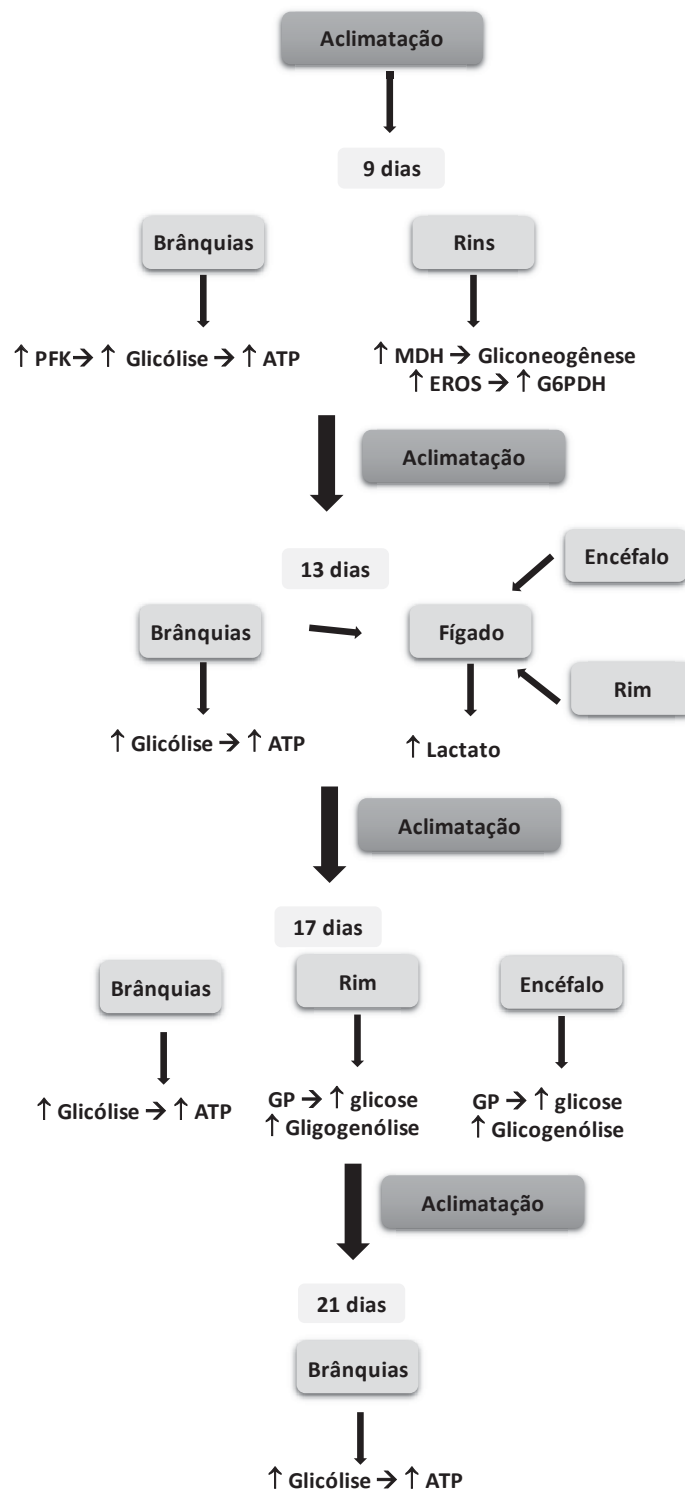
As mudanças climáticas se dão ao longo de décadas e séculos e exigem dos organismos antárticos (RENWICK, 2002; MEREDITH; KING, 2005; TURNER *et al.*, 2005; QIU, 2012; OLIVA *et al.*, 2016) plasticidade fenotípica e a presença de mecanismos homeostáticos eficientes para garantir a sobrevivência diante de um evento estressor pelo tempo necessário até que uma adaptação seja efetiva (SOMERO, 2010; PECK, 2011).

A plasticidade fenotípica e a capacidade de aclimação já foram relatadas em algumas espécies de peixes antárticos. Para *T. bernacchii*, houve aumento na taxa de rotina metabólica quando os animais foram expostos a um aumento agudo de 4°C, mas após aclimação essa taxa retornou aos níveis semelhantes ao grupos controles mantidos a 0°C, concluindo que houve um perfeito ajustamento metabólico para essa espécie. No entanto, após longa aclimação verificaram uma menor taxa de crescimento dos animais indicando que o custo metabólico pode se refletir em outros parâmetros, especialmente àqueles em se considera o organismo como um todo (por exemplo: taxa de crescimento, reprodução, consumo de alimento e mortalidade) (SANDERSFELD *et al.* 2015).

Nesse estudo, o objetivo foi avaliar a capacidade do peixe antártico *Nothotenia rossii* de se adaptar a um aumento gradual de temperatura.

Quanto aos diversos parâmetros bioquímicos e metabólicos avaliados, a temperatura foi capaz de promover alterações metabólicas nas vias do metabolismo energético de carboidratos em *N. rossii* em todos os órgãos estudados, isto é, brânquias, rim, encéfalo e fígado (Figura 8). Observou-se aumento significativo dos níveis de atividade das enzimas MDH e G6PDH renal e PFK branquial em 9 dias (2°C); da PFK branquial e da concentração de lactato hepático em 13 dias (4 °C), da GP renal e encefálica e da PKF branquial, em 17 dias (6 °C) e, por fim, aos 21 (8 °C) aumento nos níveis de atividade da PFK branquial.

FIGURA 8- ESQUEMA DE ALTERAÇÕES DE BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO AO LONGO DO TEMPO EM *Nothotenia rossii* QUANDO SUBMETIDOS À ESTRESSE TÉRMICO GRADUAL



LEGENDA: *Nothotenia rossii* quando submetido ao aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia). ATP- Adenosina trifosfato; EROS- espécies reativas de oxigênio; G6PDH- glicose-6-fosfato-desidrogenase; GP- glicogênio fosforilase; MDH- malato desidrogenase; PFK- fosfofrutoquinase.

Com 9 dias de exposição quando os peixes se encontravam em 2°C, observou-se um aumento significativo no nível de atividade da PFK nas brânquias de *N. rossii* indicando um estímulo da via glicolítica. A atividade dessa enzima fica aumentada sempre que o suprimento de ATP da célula estiver prejudicado, seja pela capacidade limitada de um indivíduo captar oxigênio, seja pela sua baixa disponibilidade ou ainda pela maior demanda de oxigênio em determinadas condições, como o observado em elevadas temperaturas (ABELE *et al.*, 1998). Stroebel *et al.* (2013) identificaram maior taxa de rotina metabólica associada à crescente demanda de oxigênio como tentativa de compensação em *N. rossii*.

Esse comportamento, de aumento da quebra de glicose, se estendeu por todo o período experimental evidenciando a contínua demanda da via glicolítica durante todo o período de experimento. Estes resultados são consistentes com Evans *et al.*, 2005, que demonstraram que as brânquias são o primeiro órgão a ser afetado diante da depleção de oxigênio, indicando o papel-chave desse órgão nas situações de estresse a longo prazo.

Nesse mesmo tempo experimental, aos 9 dias e 2°C, observou-se no rim de *N. rossii* aumento na atividade da MDH. Esse aumento pode ser decorrente de um incremento na via gliconeogênica, tendo em vista que essa enzima é fonte importante de oxaloacetato, produto intermediário da gliconeogênese visando a exportação de glicose para outros tecidos. Esse estímulo da atividade de MDH não foi visualizado no modelo de estresse agudo, em nenhum dos tecidos analisados (rins, coração e músculo) de *N. rossii* (FORGATI *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018).

O aumento da G6PDH, neste órgão, na mesma condição experimental, isto é, 2°C e 9 dias, indica ativação da via das pentose-fosfato, que tem como um produto final o NADPH. Esse aumento de NADPH pode estar relacionado a um aumento da necessidade de proteção contra EROs tendo em vista que a produção de GSH é estreitamente relacionada aos níveis de NADPH.

Essa via também é ativada quando há rápida redução de NADH a NADP⁺, como em situações de gliconeogênese. Nesse caso, a relação NADP⁺/NADH serve como mecanismo regulador e desvia a glicose da via glicolítica para a via das pentose-fosfato.

O NADPH, produto final da via das pentoses, é também importante para tecidos onde há síntese de hormônios esteroides, como nas glândulas suprarenais. Portanto, a demanda na produção desses hormônios pode também influenciar a ativação da via das pentose-fosfato. A liberação de hormônios corticosteroides e de catecolaminas configuram uma resposta primária ao estresse (BARTON, 2002) comumente relatadas em vários estudos em peixes antárticos (KANDALSKI *et al.*, 2018).

O aumento das enzimas PFK branquial e MDH renal evidenciado, neste trabalho, não foi observado em trabalhos de estresse agudo, quando há mudança abrupta de temperatura (PÖRTNER, 2002; STROEBEL *et al.*, 2013; FORGATI *et al.*, 2017).

Nos estudos de estresse agudo nota-se pronta resposta, embora de curta duração, da via glicolítica e do ciclo do ácido cítrico à condição estressora, com predominância para uma condição inicial de inibição (PÖRTNER, 2002; STROEBEL *et al.*, 2013; FORGATI *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018) e relativo rápido reestabelecimento das atividades enzimáticas a seus níveis basais. As respostas da via glicolítica encontradas nas brânquias nessa exposição gradual de longo prazo, em contraste, foram mais extensas pois persistiram durante toda a exposição ao agente estressor quando comparadas aos demais órgãos e a modelos de estresse agudo.

As respostas renais, embora menos extensas, indicam a importância desse órgão para o restabelecimento do equilíbrio energético através das vias da gliconeogênese e glicogenólise. Em contraste, nos modelos de estresse agudo (6h/8°C) as vias glicolítica e aeróbica de produção de ATP são fundamentais para atender o aumento da demanda energética neste órgão (FORGATI *et al.*, 2017).

O mesmo foi visto em outra espécie, para *T. bernachii* a atividade da CS foi menor no coração e músculo esquelético quando aclimatadas em 4,5 °C por 14 dias, sem aumento gradual de temperatura, quando comparadas a grupos aclimatados em -1 °C e 2 °C (JAYASUNDARA *et al.*, 2013).

O efeito isolado do tempo nos marcadores enzimáticos e metabólicos nas brânquias, em 9 dias, indica ativação do metabolismo anaeróbio, de gliconeogênese e de glicogenólise expressos pelo aumento das atividades

enzimáticas da LDH, MDH e GP, respectivamente. No rim o tempo isoladamente também foi capaz de aumentar a via glicolítica expresso pelo aumento da atividade da HK, CS e PFK. O efeito isolado do tempo também promoveu alteração nos níveis de atividade da G6PDH hepática e da HK e PFK encefálica.

O aumento da via glicolítica e de outras vias do metabolismo energético de carboidratos, estimulado pelo fator tempo unicamente, não foi observado em situações de estresse agudo (até 144hs) em brânquias e rins (FORGATI *et al.*, 2017). Enfatizando que esse fator é também relevante para promover alterações metabólicas (PECK, 2011) e que *N. rossii* parece tolerar tempos curtos em situações experimentais.

Em 13 dias de aclimação (4°C) observou-se aumento da atividade da PFK branquial e da concentração de lactato hepático o que pode indicar a ativação da via anaeróbia no fígado de *N. rossii*.

O estímulo do metabolismo anaeróbio, em condições de estresse agudo também foi observado em rim com rápido restabelecimento (FORGATI *et al.*, 2017), e em músculo esquelético em situações de aclimação mais prolongada (WINDISH *et al.*, 2011; JAYASUNDARA *et al.*, 2013). Resultados semelhantes foram encontrados em *T. bernachii*, *P. borchgrevinki* e *T. newnesi* em estudo a longo prazo, com mudança abrupta de temperatura, com múltiplos estressores, entre eles a temperatura (ENZOR *et al.*, 2017).

O aumento significativo da concentração de lactato hepático também pode ser explicado pela exportação desse metabólito a partir de outros órgãos, para sua conversão em piruvato (ciclo de Cori). O maior exportador de lactato é o tecido muscular e para *N. rossii* e *N. coriiceps* já se constatou maior performance de natação em temperaturas mais elevadas (MACHADO *et al.*, 2014), o que poderia justificar um incremento dos níveis hepáticos desse metabólito observados nesse estudo.

O ciclo de Cori é particularmente importante para espécies carnívoras (STONE, 2003; ENES *et al.*, 2006; KIRCHNER *et al.*, 2008; DAI *et al.*, 2015; RITO *et al.*, 2017) assim como *N. rossii*, pois grande parte da glicose circulante provém da gliconeogênese (VIEGAS *et al.*, 2013). Os precursores mais importantes da gliconeogênese nesses casos são os aminoácidos

glicogênicos provenientes da dieta ou o piruvato proveniente da glicólise e o ciclo de Cori funciona como uma fonte de recuperação da glicose (RITO *et al.*, 2017).

Os níveis de atividade da GP encefálica e renal em *N. rossii* aumentaram com 17 dias indicando a necessidade de glicose nesses tecidos. Nesse caso, os estoques de glicogênio devem ser mobilizados para o uso da mesma célula. Provavelmente regulados pelo glucagon, secretado pelas células α pancreáticas. Quando o glucagon está aumentado ele promove os processos de gliconeogênese e glicogenólise. Além desse hormônio estar relacionado com o estado alimentar dos peixes, os níveis de insulina e glucagon também são influenciados pela temperatura (NAVARRO, 2002).

No encéfalo sabe-se que processos neurais requerem muita energia e essa demanda é suprida principalmente pela glicose (SOENGAS; ALDEGUNDE, 2002). Nele, o glicogênio é o principal carboidrato de reserva, utilizado como fonte de energia em certas situações estressoras (GHOSH *et al.*, 2005; DIENEL; CRUZ, 2014;).

A evidência de glicogenólise nesse órgão contrasta com estudos de estresse agudo, onde não se observou alterações nos níveis de atividade da GP em *N. rossii* (PRZEPIURA *et al.*, 2019).

Em nosso estudo, é possível que a glicose exportada pelo rim através do mecanismo da gliconeogênese tenha sido suficiente para manter o metabolismo energético no encéfalo e no próprio rim, nos primeiros dias de experimento. Entretanto, após 17 dias e 6 °C tornou-se necessária a ativação da glicogenólise.

Considerando o estudo de Przepiura *et al.* (2019) em que não se observou evidências da glicogenólise no encéfalo pode-se inferir que, em modelos de estresse térmico a longo prazo, o tempo de exposição em combinação com a intensidade do agente estressor, neste caso a temperatura, pode ser mais relevante que a própria temperatura isoladamente.

O efeito isolado do tempo também promoveu alterações nos níveis de atividades das enzimas G6PDH branquial, LDH renal, e GP hepática aos 21 dias. As brânquias ao longo do tempo restabeleceram o equilíbrio energético, contrastando com o efeito isolado do tempo observado pelo aumento da

atividade da PFK. E em 21 provavelmente, houve a necessidade de proteção contra EROs.

Também sob o efeito isolado do tempo, as enzimas glicolíticas renais restabeleceram seus valores basais, à exceção da CS que está aumentada em relação aos grupos de 13 e 17 dias, mas não ao grupo de 9 dias. E a atividade aumentada de LDH indica ativação do metabolismo anaeróbio. No fígado o aumento da atividade de GP indica a necessidade de glicogenólise nesse órgão.

As diferentes respostas entre modelos de estresse agudo e gradual podem ser explicadas tendo em mente os fatores que determinam o estresse térmico, pois além do tempo de resposta entre órgãos e tecidos ser variável, as respostas metabólicas dependem da intensidade do estresse e do tempo (PECK, 2011).

A aclimação parece afetar de maneira diferente os órgãos, sendo necessário ajustes específicos em diferentes vias metabólicas para adequação ao evento estressor. Para os tecidos hepático, renal e encefálico, aos 21 dias, as alterações metabólicas cessam e todos os biomarcadores retornam ao seu estado basal, sugerindo que houve uma acomodação, um ajuste, da condição metabólica, frente à situação estressora. Porém, no mesmo tempo experimental observou-se aumento persistente da via glicolítica no tecido branquial. Sob essa perspectiva pode-se dizer que houve um processo de aclimação mesmo que parcial em *N. rossii* nesse modelo experimental.

As alterações metabólicas observadas nesse trabalho refletem tentativas de ajustes para o restabelecimento de um patamar fisiológico estável em *N. rossii*. Com exceção das brânquias, os demais órgãos foram capazes de utilizar diferentes estratégias, caracterizadas pelas vias metabólicas deflagradas, e reestabelecer níveis estáveis de atividades enzimáticas e de porção de intermediários metabólicos.

Essa capacidade demonstra que *N. rossii* apresenta plasticidade frente a situação estressora de aumento gradual de temperatura, configurando um mecanismo de aclimação. A plasticidade fenotípica e a capacidade de aclimação já foram relatadas em algumas espécies de peixes antárticos, incluindo *N. rossii* (LOWE; DAVIDSON, 2005; HUDSON *et al.*, 2008; THORNE

et al., 2010; WINDISH *et al.*, 2011; STROEBEL *et al.*, 2012; STROEBEL *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2014).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo investigou o efeito do aquecimento gradual em parâmetros metabólicos enzimáticos e não enzimáticos nos tecidos encefálico, renal, branquial e hepático de *N. rossii* tendo em vista que essas variáveis são importantes indicadores de estresse e do estado metabólico energético de peixes.

A aclimação gradual deflagrou mecanismo de ativação persistente da via glicolítica no processo de glicólise em brânquias em contraste com modelos de estresse agudo onde a alteração é curta e transiente. Nos rins, o processo desencadeado foi o da gliconeogênese mostrando a importância desse órgão como exportador de glicose em situações de estresse térmico.

No fígado foi necessária a ativação da via anaeróbia para produção de ATP em resposta à falta de oxigênio já evidenciada anteriormente pela gliconeogênese renal. No rim e encéfalo também se observou a necessidade do mecanismo da glicogenólise em 17 dias (6°C) para se restabelecer o equilíbrio energético, enfatizando mais uma vez a importância do rim como exportador de glicose em *N. rossii* já que esse feito aparentemente manteve a demanda energética equilibrada para o encéfalo, provavelmente por ser um órgão vital.

Nossos resultados também indicam que houve forte evidência de aclimação fisiológica de *N. rossii* em nossa condição experimental, dado o restabelecimento dos patamares fisiológicos ao longo do tempo. O que indica que essa espécie apresenta plasticidade e habilidades fenotípicas para tolerar mudanças nessa escala.

7 REFERÊNCIAS

ABELE, D.; BURLANGO, B.; VIARENGO, A.; PÖRTNER, H.O. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. **Comparative Biochemical Physiology part B**. v. 120, p.425 -435, 1998

ALMROTH, B. C.; ASKER, N.; WASSMUR, B.; ROSENGRE, M.; JUTFELE, F.; GRÄNS, A.; SUNDELL, K.; AXELSSON, M.; STURVE, J. Warmer water temperature results in oxidative damage in an Antarctic fish, the bald notothen. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 468, p. 130–137, 2015.

ANDERSON, M. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**. v.26, p.32 – 46, 2011.

ANGILLETTA, M.J.JR. A Theoretical and Empirical Synthesis. Oxford University Press, New York. 2009.

BALDWIN, J.; ELIAS, J.P.; WELLS, R.M.G; DONOVAN, D.A. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: comparisons with temperate abalone species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v.342, p.213–225, 2007.

BARTON, B.A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v.42 n.3, p.517-525, 2002.

BASU, N.; TODGHAM, A. E.; ACKERMAN, P. A.; BIBEAU, M. R.; NAKANO, K.; SCHULTE, P. M.; IWAMA, K. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. **Gene**. v. 295, p. 173-183, 2002.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of rotein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BIDINOTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico CEPTA Pirassununga** v. 10, p. 53-60, 1997.

BUCKLEY, B. A.; PLACE, S. P.; HOFMANN, G. E. Regulation of heat shock genes in isolated hepatocytes from an Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*. **Journal of Fish Biology**, v.207, p.3649–3656, 2004.

CHAPMAN, W.L.; WALSH, J.E. A synthesis of antarctic temperature. **Journal of Climate**. v. 20, p.4096-4117, 2007.

CHANG, J. C.-H.; WU, S.-M.; TSENG, Y.-C.; LEE, Y.-C.; BABA, O.; HWANG, P.-P. Regulation of glycogen metabolism in gills and liver of the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during acclimation to seawater. **The Journal of Experimental Biology**. v. 210, p. 3494-3504, 2007.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, p. 273-283, 1979.

CIARDELLO, M.; CAMARDELLA, L.; DI PRISCO, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two Antarctic teleosts: correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1250, p. 76–82, 1995.

COMISO, J.C. Large decadal decline of the arctic multiyear ice cover. **Journal of Climate**, v. 25, p. 1176-1193, 2012.

CONVEY, P.; BINDSCHADLER, R.; DI PRISCO, G.; FAHRBACH, E.; GUTT, J.; HODGSON, D.A.; MAYEWSKI, P.A.; SUMMERHAYES, C. P.; TURNER, J. Antarctic climate change and the environment. **Antarctic Science**, v. 21, p. 541– 563, 2009.

COOK, A. J.; HOLLAND, P. R.; MEREDITH, M. P.; MURRAY, T.; LUCKMAN, A.; VAUGHAN, D. G. Ocean forcing of glacier retreat in the western Antarctic Peninsula. **Science**, v. 353, n. 6296, p. 283–286, 2016.

DE ANGELIS, H.; SKVARCA, P. Glacier surge after ice shelf collapse. **Science**, v. 299, p. 1560-1562, 2003.

PRZEPIURA, T.C.S.; HERRERIAS, T.; KANDALSKI, P.K.; ZALESKI, T.; MACHADO, C.; FORGATI, M.; DONATTI, L. Metabolic responses in Antarctic Nototheniidae brains subjected to thermal stress. **Brain Research**, 2019.

DE VRIES, A.L.; CHENG, C.H. Antifreeze proteins and organismal freezing avoidance in polar fishes. In *Fish Physiology Series, the Physiology of Polar Fishes*, Vol. 22 (ed. A. P. Farrell and J. F. Steffenson), pp. 155-201. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2005.

DIENEL, G.A.; CRUZ, N.F. Contributions of glycogen to astrocytic energetics during brain activation. **Metabolic Brain Disease**, v. 30, p. 281–298, 2014.

DONATTI, L.; FANTA, E. Influence of photoperiod on visual prey detection in the Antarctic fish *Nothotenia neglecta* Nybelin. **Antarctic Science**, v. 14, p. 146–150, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-335, 1956.

EASTMAN, J.T. **Antarctic Fish Biology: Evolution in a Unique Environment**. San Diego: Academic Press, 1993.

ENES, P.; PANSERAT, S.; KAUSHIK, S.; OLIVA-TELES, A. Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose

metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular Integrative Physiology**. p. 89-96, 2006.

ENZOR, L.A.; HUNTER, E.M.; PLACE, S.P. The effects of elevated temperature and ocean acidification on the metabolic pathways of notothenioid fish. **Conservation physiology**. v.5, n.1, 2017

EKAU, W. Morphological Adaptations and Mode of Life in High Antarctic Fish. In: di Prisco G., Maresca B., Tota B. (eds) *Biology of Antarctic Fish*. Springer, Berlin, Heidelberg. 1991.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**. v. 85, p. 97-177. 2005.

FATHI, A. R.; KRAUTHEIM, A.; LUCKE, S.; BECKER, K.; STEINFELDE, R. H. J. Nonradioactive technique to measure protein phosphatase 2A-like activity and its inhibition by drugs in cell extracts. **Analytical Biochemistry**, v. 310, n. 2, p. 208-214, 2002.

FLOWER, B.P.; KENETT, J.P. (1994) The middle Miocene climatic transition: East Antarctic ice sheet development, deep ocean circulation and global carbon cycling. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**. v.108, p. 537–555, 1994.

FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; MACHADO, C.; SOUZA, M. R. D. P.; DONATTI, L. Effects of heat stress on the renal and branchial carbohydrate metabolism and antioxidant system of Antarctic fish. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 0, n. 0, p. 1–18, 2017.

HARROWER, J.R.; BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 32, p. 224-228, 1972.

GOSH, A.; CHEUNG, Y.Y.; MANSFIELD, B.C.; CHOU, J.Y. Brain Contains a Functional Glucose-6-Phosphatase Complex Capable of Endogenous Glucose Production. **Journal of Biological Chemistry**. v. 280, p. 11114–11119, 2005.

HOFMANN, G.E.; LUND, S.G.; PLACE, S.P.; WHITMER, A.C. Some like it hot, some like it cold: the heat shock response is found in New Zealand but not Antarctic notothenioid fishes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v.316 p.79-89, 2005

HUDSON, H. A.; BRAUER, P. R.; SCOFIELD, M. A.; PETZEL, D. H. Effects of warm acclimation on serum osmolality, cortisol and hematocrit levels in the Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v. 31, n. 8, p. 991–997, 2008.

JAYASUNDARA, N.; HEALY, T. M.; SOMERO, G. N. Effects of temperature acclimation on cardiorespiratory performance of the Antarctic notothenioid *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v. 36, n. 7, p. 1047–1057, 2013.

JOUGHIN, I.; SMITH, B.E.; MEDLEY, B. Marine ice sheet collapse potentially underway for the Thwaites glacier basin, west Antarctica. **Science**, v.344, n. 6185, p.735-738, 2014.

KANDALSKI, P.K.; SOUZA, M. R. D. P.; HERRERIAS, T.; MACHADO, C., ZALESKI, T., FORGATI, M.; GUILLEN, A.C.; VIANA, D.; MOURA, M.; DONATTI, L. Effects of short-term thermal stress on the plasma biochemical profiles of two Antarctic nototheniid species. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 2018

KIRCHNER, S.; PANSEERAT, S.; LIM, P.L.; KAUSHIK, S.; FERRARIS, R.P. The role of hepatic, renal and intestinal gluconeogenic enzymes in glucose homeostasis of juvenile rainbow trout. **Journal of Comparative Physiology part B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.** v. 178, p. 429-438, 2008.

LOWE, C. J.; DAVISON, W. Plasma osmolality, glucose concentration and erythrocyte responses of two Antarctic nototheniid fishes to acute and chronic thermal change. **Journal of Fish Biology**, v. 67, p.752-766, 2005.

LU, G. D. The metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochemical Journal**, v. 33, p. 249-254, 1939.

MACHADO, C.; ZALESKI, T.; RODRIGUES, E.; CARVALHO, C. D. S.; CADENA, S. M. S. C.; GOZZI, G. J.; KREBSBACH, P.; RIOS, F. S'A.; DONATTI, L. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Nothotenia coriiceps* and *Nothotenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.172–173, p.21–28, 2014.

MEREDITH, M. P.; KING, J. C. Rapid climate change in the ocean west of the Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century. **Geophysical Research Letters**, v. 32, n. 19, p. 1–5, 2005.

NAVARRO, I.; ROJAS, P.; CAPILLA, E.; ALBALAT, A.; CASTILLO, J.; MONTSERRAT, N.; CODINA, M.; GUTIÉRREZ, J. Insights into insulin and glucagon responses in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, 27: 205–216, 2002.

OLIVA, M.; NAVARRO, F.; HRBACEK, F.; HERNANDEZ, A.; NYVLT, D.; PEREIRA, P.; RUIZ-FERNANDEZ, J.; TRIGO, R. Recent regional climate cooling on the Antarctic Peninsula and associated impacts on the cryosphere, **Science Total Environmental**. 2016

PECK, L.S.; WEBB, K.E.; BAILEY, D.M. Extreme sensitivity of biological function to temperature in Antarctic marine species. **Functional Ecology**, v.18, p.625-630, 2004.

PECK, L.S. Organisms and responses to environmental change. **Marine Genomics**.v. 4, p. 237-243, 2011.

PETRICORENA, Z.L.; SOMERO, G.N. Biochemical adaptations of notothenioid fishes: comparisons between cold temperate South American and New Zealand species and Antarctic species. **Comparative Biochemistry and Physiology, part A: Molecular and Integrative Physiology**.v. 147, p.799–807,2007.

PLACE, S.P.; ZIPPAY, M.L.; HOFMANN, G.E. Constitutive roles for inducible genes: evidence for the alteration in expression of the inducible hsp70 gene in Antarctic notothenioid fishes. **American Journal of Physiology**. v. 287, p.429-R436, 2004.

PÖRTNER H.O. Physiological basis of temperature-dependent biogeography: trade-offs in muscle design and performance in polar ectotherms. **The Journal of Experimental Biology**. v. 205, p.2217–2230, 2002.

PÖRTNER, H.O.; PECK, L.S.; SOMERO, G. Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. **Philosophy Transactions of Royal Society part B**. v. 362.2007

PÖRTNER, H.O.; PECK, M.A. Climate change affects on fish and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. **Journal of fish Biology**. v.77, n.8, p.1745-1779. 2010.

QIU, J. Climate change. winds of change. **Science**. v.338,p.879–881.2012.

R: DEVELOPMENT CORE TEAM (2013) A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-90051-07-0. URL R-Project.org.

RENWICK, J.A. Southern hemisphere circulation and relations with sea ice and sea surface temperature. **Journal of Climate**. v.15, p.3058-3068, 2002

RITO, J.; VIEGAS, I.; PARDAL, M. A.; JONES, J. G. Evidence of extensive plasma glucose recycling following a glucose load in seabass. **Comparative**

Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. v.211, p.41–48, 2017

RODRIGUES Jr E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M. SUDA, C. N. K.; VANI, G. S.; DONATTI, L. RODRIGUES, E.; LAVRADO, H. P. Metabolic responses of the Antarctic fishes *Nothotenia rossii* and *Nothotenia coriiceps* to sewage pollution. **Fish Physiology and Biochemistry.** v. 41, n. 5, p. 1205-1220, 2015.

SABOROWSKI, I. R.; BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology,** v. 140, p. 557-565, 2002.

SANDERSFELD, T.; DAVISON, B.; LAMARE, M.; KNUST, R.; RICHTER, C.. Elevated temperature causes metabolic trade-offs at the whole organism level in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **The Journal of experimental biology.** v. 218, 2015

SOENGAS, J.L.; ALDEGUNDE, M. Energy metabolism of fish brain. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.** v. 131, p. 271–296, 2002

SOMERO, G. The physiology of climate change: How potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. **The Journal of experimental biology.** v.213, p.912-20, 2010.

SOUZA, M. R. D. P.; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; MACHADO, C.; SILVA, D. T.; PIECHNIK, C. A.; MOURA, M. O.; DONATTI, L. Heat stress in the heart and muscle of the Antarctic fishes *Nothotenia rossii* and *Nothotenia coriiceps*: Carbohydrate metabolism and antioxidant defence. **Biochimie,** v. 146, p. 43-55, 2018.

STONE, D.A.J. Dietary carbohydrate utilization by fish. **Reviews of Fisheries Science.** v. 11, p. 337-369, 2003

STROBEL, A.; BENNECK, S.; LEO, E.; MINTERBECK, K.; PÖRTNER, H.O.; MARK, F.C. Metabolic shifts in the Antarctic fish *Nothotenia rossii* in response to rising temperature and PCO₂. **Frontiers of Zoology.** v.9, n. 28.2012

STROBEL, A.; LEO, E.; PÖRTNER, H.O.; MARK, F.C. (2013) Elevated temperature and PCO₂ shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of *Nothotenia rossii*. **Comparative Biochemistry Physiology part B.** v.166, p.48–57, 2013.

THIBERT-PLANTE, X.; HENDRY, A.P. The consequences of phenotypic plasticity for ecological speciation. **Journal of Evolutionary Biology.** v. 24, p.326–342, 2011.

THORNE, M.A.S.; BURNS, G.; FRASER, K.P.P.; HILLYARD, G.; CLARK, M.S. Transcription profiling of acute temperature stress in the Antarctic plunderfish *Harpagifer antarcticus*. *Marine Genomics*. v.3, n.1, p. 35-44, 2010.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.85, n.3, p.603-611, 2005.

TURNER, J.; COLWELL, S.R.; MARSHALL, G.J.; LACHLAN-COPE, T.A.; CARLETON, A.M.; JONES, P.D.; LAGUN, V.; REID, P.A.; IAGOVKINA, A, S. Antarctic climate change during the last 50 years. **International Journal of Climatology**, v.25, p.279-294, 2005.

WINDISCH, H. S.; FRICKENHAUS, S.; JOHN, U.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. O.; LUCASSEN, M. Stress response or beneficial temperature acclimation: Transcriptomic signatures in Antarctic fish (*Pachycara brachycephalum*). **Molecular Ecology**, v. 23, n. 14, p. 3469–3482, 2014.

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**. v. 60, p. 340–347, 2002.

CAPÍTULO II

Efeito do aumento gradual de temperatura sobre o sistema de defesa antioxidante e parâmetros metabólicos plasmáticos em peixes antárticos *Nothotenia rossii*

RESUMO

A Antártica é considerada um ecossistema termicamente estável, no entanto, estudos climáticos apontam para aumentos da temperatura do ar e das águas superficiais nessa região. Essas alterações térmicas podem ter impacto nos processos biológicos dos animais que ali habitam pois são fatores de estresse e podem promover alterações metabólicas tornando-os mais vulneráveis às injúrias oxidativas. Parâmetros plasmáticos também são bons indicadores de estresse e permitem analisar o estado metabólico de peixes diante de aumentos de temperatura. O presente trabalho verificou o efeito da temperatura de aclimação nos níveis de parâmetros plasmáticos, osmorregulatórios e do metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes nos tecidos renal, branquial, hepático e encefálico de *Nothotenia rossii*, submetidos à mudança gradual de temperatura de 0,5 ° C / dia, até as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 ° C. Sob o efeito da taxa de aclimação de 0,5°C/dia o tecido branquial apresentou um aumento da atividade da glutathione-S- transferase (GST) e o rim da H⁺-ATPase aos 9 dias de experimento (2°C). No fígado houve aumento constante na concentração de MDA como indicativo de lipoperoxidação (9 (2°C), 13(4°C), 17(6°C) e 21(6°C) dias) e da GSH em 9 dias (2°C). No plasma houve diminuição constante da concentração de proteínas totais e globulinas. Essas respostas indicam a presença de plasticidade térmica e tentativa de regulação para mitigar o estresse térmico. As alterações demonstram que o aumento gradual de temperatura pode causar respostas opostas ao modelo de choque térmico em *N. rossii*.

Palavras-chave: *Nothotenia*. Estresse oxidativo. Temperatura. Baía do Almirantado.

1 INTRODUÇÃO

A Antártica e o oceano Austral, apesar de serem considerados ecossistemas termicamente estáveis, têm registrado aumento de temperatura ao longo das últimas décadas. Estudos climáticos na Península Antártica, local deste estudo, mostram que há aumento das temperaturas do ar e de águas superficiais nessa região (TURNER *et al.*, 2005; STASTNA, 2010; KEJNA *et al.*, 2013, TURNER *et al.*, 2014 estão mais altas quando comparadas com o restante do continente Antártico (CONVEY *et al.*, 2009).

Esses aumentos de temperatura podem levar a alterações na cadeia alimentar desses ecossistemas (ATKINSON *et al.*, 2004) e ainda afetar as taxas de processos biológicos e influenciar o desempenho dos animais (HUEY; STEVENSON, 1979; JOHNSON; BENNETT, 1995, PÖRTNER; PECK, 2010). Apesar da vulnerabilidade destes organismos às mudanças climáticas globais, observa-se que alguns apresentam uma maior plasticidade que outros (PECK, 2002). Estudos realizados com peixes antárticos indicaram menor tolerância aguda ao calor nestes organismos quando comparados a espécies não antárticas (PODRABSKY; SOMERO, 2006; BILYK; DE VRIES, 2011; BEERS; JAYASUNDARA, 2015).

Acredita-se que este grupo de teleósteos, os nototheniídeos, evoluiu e desenvolveu mecanismos de adaptações às temperaturas extremamente baixas e estáveis que são responsáveis pela sua sobrevivência nesse ambiente (BUCKLEY *et al.*, 2004; PLACE *et al.*, 2005; DE VRIES e CHENG, 2005; HOFMANN *et al.*, 2000). Dentre as características adaptativas, os nototheniídeos desenvolveram uma alta concentração de solutos em seu citosol, apresentando uma alta osmolaridade plasmática e um aumento da área de superfície e densidade mitocondrial (SIDEL; HAZEL, 1987; SIDELL, 1998; GUDERLEY; ST-PIERRE, 2002; ABELE; PUNTARULO, 2004).

Essas características auxiliam a tolerância à alta solubilidade de oxigênio nas águas oceânicas frias determinando que peixes antárticos apresentem uma maior concentração de oxigênio em seus tecidos e, por consequência, maiores níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ANSALDO *et al.*, 2000; ABELE; PUNTARULO, 2004).

Aumentos de temperatura são fatores de estresse para organismos antárticos, pois podem promover alterações no transporte de elétrons da membrana mitocondrial interna, gerando dessa forma, ainda mais EROs tornando-os mais vulneráveis às injúrias oxidativas (PÖRTNER, 2002; ABELE; PUNTARULO, 2004; MUELLER *et al.*, 2011;). As EROs podem vir a ser neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante. Entretanto, quando há o desequilíbrio entre este e a geração de EROs pode haver oxidação de biomoléculas e dano irreversível à célula bem como elevar os custos energéticos para a manutenção celular basal (ABELE; PUNTARULO, 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Parâmetros plasmáticos são indicadores de estresse (BEGG; PANKHURST, 2004; LOWE; DAVIDSON, 2005; JIN; DEVRIES, 2006; RODRIGUES JR *et al.*, 2013; KREISS *et al.*, 2015; KANDALSKI *et al.*, 2018) e do estado metabólico de peixes (BEGG; PANKHURST, 2004). Parâmetros como a glicose e o cortisol são consagrados marcadores de estresse em peixes (BEGG; PANKHURST, 2004). O aumento dos níveis plasmáticos dos hormônios corticoides e das catecolaminas é considerado a resposta primária ao estresse (BARTON, 2002). Além disso, o cortisol cumpre importante papel na osmorregulação através do seu efeito na estimulação da atividade da Na^+/K^+ -ATPase e redução da osmolalidade sérica resultante da perda de Na^+ e Cl^- (GONZALEZ-CABRERA *et al.*, 1995; GUYNN *et al.*, 2002; PETZEL, 2005).

Apesar de estudos sobre tolerância térmica e aclimação demonstrarem que peixes antárticos são capazes de se aclimatar a um aumento de temperatura conhecidos (SOMERO; DE VRIES, 1967; WILSON *et al.*, 2002; THORNE *et al.*, 2010; BILYK; DE VRIES, 2011; STROBEL *et al.*, 2012;), os custos e mecanismos dessa aclimação são pouco conhecidos.

Considerando que mudanças graduais de temperatura podem permitir ajustes de plasticidade, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de investigar os efeitos do aumento gradual de temperatura (0,5 °C/dia) até as temperaturas de 2°C ,4°C ,6°C e 8°C no peixe antártico *Nothotenia rossii* através da análise de marcadores de defesa antioxidante e danos celulares em brânquias, fígado, rim e encéfalo e marcadores plasmáticos, dos níveis

plasmáticos de íons, metabólitos protéicos e não proteicos, de cortisol, da enzima lactato desidrogenase (LDH) e de marcadores da osmorregulação .

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar as respostas do metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes nas brânquias, rim, fígado e encéfalo e alterações plasmáticas de *N. rossii* submetidos ao aumento gradual de temperatura (0.5°C/dia).

2.2 ESPECÍFICOS

1) Avaliar as variações na atividade das enzimas antioxidantes nas brânquias, rim, fígado e encéfalo através de análise da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) em *N. rossii* submetidos ao aumento gradual de temperatura (0.5°C/dia) até que se alcançassem as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C, 8 °C (9, 13, 17 e 21 dias).

2) Analisar variações de concentrações de glutathione reduzida (GSH), e dos marcadores de danos celulares, lipoperóxidos (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO) nas brânquias, rim, fígado e encéfalo em *N. rossii* submetidos ao aumento gradual de temperatura (0.5°C/dia) até que se alcançassem as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C, 8 °C (9, 13, 17 e 21 dias).

3) Avaliar a atividade das enzimas Na⁺/K⁺-ATPase e H⁺-ATPase nas brânquias e rim de *N. rossii* submetidos ao aumento gradual de temperatura (0.5°C/dia) até que se alcançassem as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C, 8 °C (9, 13, 17 e 21 dias).

4) Analisar as variações nas concentrações de parâmetros metabólicos plasmáticos de *N. rossii* submetidos ao aumento gradual de temperatura

(0.5°C/dia) até que se alcançassem as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C, 8 °C (9, 13, 17 e 21 dias).

5) Analisar a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e as concentrações dos intermediários metabólicos lactato, piruvato e glicogênio no plasma *N. rossii* submetidos ao aumento gradual de temperatura (0.5°C/dia) até que se alcançassem as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C, 8 °C (9, 13, 17 e 21 dias).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Declaração de ética

O trabalho foi executado de acordo com a ética e regras das leis brasileiras e do Tratado Antártico. O Ministério do Meio Ambiente concedeu a licença ambiental e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (CEUA - UFPR) sob o nº 496/2010 e 840/2015.

3.2 Coletas e manutenção dos animais

Os peixes foram capturados com linha e anzol, a uma profundidade de 10 a 25 metros, na Baía do Almirantado (*Punta Plaza* - 62° 05' 64,5" S; 58° 24' 31.7" W e Arctowski - 62° 10' .65" S; 58° 26.5' W), Ilha Rei George, Península Antártica. Em seguida, foram transportados dos locais de coleta para a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) (62°05'0"S/58°23'28"W) e mantidos (n = 7 peixes por tanque de 1000 litros) sob condições controladas de temperatura (0°C + 0.5), salinidade (35psu + 0.5), fotoperíodo (12 horas luz/12 horas escuro) e aeração constante por 5 dias (DONATTI; FANTA, 2002). Os peixes foram identificados com linhas coloridas e selecionados aleatoriamente para compor os grupos experimental e controle para os tempos de 9,13,17 e 21 dias de experimento

3.3 Aumento gradual da temperatura

Exemplares de *N. rossii* (n =56; comprimento= 34 ± 3 cm, peso= 443 ± 134 g) foram submetidos a um aumento gradual da temperatura, isto é, a cada 24 horas, houve aumento de 0,5°C na temperatura da água. No primeiro dia de experimento a temperatura da água nos tanques era de 0°C. Termostatos Aquaterm 09-01T-11457 (Full Cauge) acoplados a aquecedores (Altman) foram utilizados até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8°C fossem atingidas. Os peixes foram então mantidos nas respectivas temperaturas durante 96 horas (4 dias), totalizando 9 (2°C), 13 (4°C), 17 (6°C) e 21 (8°C) dias de experimentos.

A cada dois dias os tanques foram limpos e 50% da água renovada, com temperatura controlada de acordo com o experimento. Os peixes foram

alimentados individualmente (JAYASUNDARA *et al.* 2013; ALMROTH *et al.* 2015; RODRIGUES JR *et al.* 2015), a cada 48h, com músculo epaxial de peixe (1% da sua massa corporal), alternando-se à troca de água dos tanques. Peixes que não se alimentavam foram excluídos dos experimentos. Para todos os grupos, o primeiro dia de experimento foi o primeiro dia da oferta de alimento. Os grupos experimentais e seus respectivos grupos controle foram alimentados nos mesmos horários (FORGATI *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018)

Ao fim de cada experimento, foi realizada a coleta de sangue com seringa heparinizada mediante punção da veia caudal. O plasma foi obtido após centrifugação do sangue total a 2000 rpm por 10 minutos. Em seguida os peixes foram anestesiados com 20 mg. L⁻¹ de benzocaína 1%, (a partir de uma solução estoque de 0.1% (p.v⁻¹) em etanol a 95%) até cessarem as respostas a quaisquer estímulos (estágio 4, de acordo com WOODY *et al.*, 2002) e eutanasiados com secção medular. Amostras de plasma, brânquias, rins (médio posterior), fígado e encéfalo foram congeladas em nitrogênio líquido. Para cada situação experimental, amostras de peixes mantidos a 0°C, considerados como controle, foram coletadas.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1. Determinação dos níveis de atividade de enzimas antioxidantes e níveis de tióis não protéicos

As análises espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplacas (EPOCH Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA).

As amostras de brânquias, rim, fígado e encéfalo foram pesadas e homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50Mm (pH 7,4) na proporção de 1:5 (pv-1) com o auxílio do homogeneizador motorizado Potter-Elvehjem. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000g, 4°C durante 10 min e o sobrenadante foi utilizado para as determinações da atividade enzimática a 20°C (JAYASUDARA *et al.* 2013; RODRIGUES JR *et al.* 2015; FORGATI *et al.* 2017, SOUZA *et al.*, 2018).

Os níveis de atividade enzimática foram expressos em nmol ou µmol de substrato convertido em produto por minuto (nmol.min⁻¹, mU; e µmol.min⁻¹,

U; respectivamente). As atividades específicas das enzimas foram expressas de acordo com a concentração de proteínas nas amostras ($\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ ou $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) após normalização para concentração de proteína de $1 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), com albumina do soro bovino como padrão.

Os níveis de atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foram baseados na inibição de cloreto de azul de nitrotetrazólio (NBT) pelo ânion superóxido e ocorre na presença de hidroxilamina (CROUCH *et al.*, 1981). A variação da absorbância foi mensurada a 560nm. Os níveis de atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foram medidos baseados no consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A variação de absorbância foi mensurada a 240nm (BEUTLER, 1975). Os níveis de atividade da glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) foram medidos baseados na redução de peróxido orgânico pela glutathione (GSH), originando glutathione dissulfídica (GSSG). A GSSG foi então reduzida pela glutathione redutase (GR) pelo poder redutor do NADPH (WENDEL, 1981), e a variação de absorbância foi mensurada a 340 nm. Os níveis de atividade da GR (EC 1.8.1.7) foram medidos baseados na oxidação de NADPH e a concomitante redução de GSSG, e a variação de absorbância foi acompanhada a 340nm (CARLBERG; MANNERVIK, 1975). Os níveis de atividade da glutathione transferase (GST) (EC 2.5.1.18) foram baseados de acordo com o método descrito por Keen *et al.*, (1976) onde a reação de GSH com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) forma o ânion tiolato (TBT), e a variação de absorbância foi acompanhada a 340nm. A concentração de GSH e de outros tióis não protéicos foram determinadas através do método descrito por Sedlak e Lindsay (1968), baseado na precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não protéicos com DTNB gerando um produto que absorve luz a 415nm.

3.4.2. Determinação dos níveis de marcadores de danos oxidativos

O índice de peroxidação lipídica (LPO) foi avaliado pelo método TBARS adaptado de Federici *et al.* (2007), em que a reação de malondialdeído (MDA) com ácido tiobarbitúrico (TBA) produz um cromóforo que pode ser medido em 535 nm. O índice de carbonilação de proteína (PCO) foi determinado usando o

método descrito por Levine *et al.* (1994), que se baseia na reação de proteínas carboniladas com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) gerando dinitrofenil hidrazonas, cuja concentração foi medida a 370 nm. A análise de PCO não foi realizada no encéfalo devido à limitações no volume das amostras obtidas.

3.4.3 Determinação de cortisol plasmático

A dosagem plasmática de cortisol foi quantificada pelo princípio do imunoenensaio enzimático, utilizando-se o Cortisol ELISA kit (Cayman Chemical, *Item Nº 500360*), seguindo as instruções do fabricante.

3.4.4 Determinação de parâmetros plasmáticos

Os níveis de albumina, colesterol, glicose, proteína total e triglicerídeos foram determinados no plasma de *N. rossii* utilizando kits reagentes da Labtest Diagnóstica S. A., Brasil. O conteúdo proteico total foi determinado pelo método do Biureto (545 nm). A fração albumínica foi quantificada pelo método do verde de bromocresol (630 nm). A glicose plasmática foi avaliada através da metodologia da glicose oxidase-Trinder (505 nm). O colesterol total foi determinado enzimaticamente na presença de esterases e da colesterol oxidase (500 nm). Os triglicerídeos foram determinados através do método enzimático pelo glicerol-3-fosfato oxidase (505 nm). O lactato plasmático foi determinado através da formação de um complexo entre o lactato e o sulfato de cobre (CuSO₄) (570 nm) (HARROWER; BROWN, 1972). A atividade da LDH foi monitorada pela oxidação do NADH a 340 nm (THUESEN *et al.*, 2005). A concentração das globulinas plasmáticas se deu através do cálculo da diferença da concentração de proteínas totais e albumina.

3.4.5 Determinação dos parâmetros osmoiônicos do plasma

Os íons cálcio, cloreto, magnésio e fosfato foram determinados utilizando kits reagentes comerciais (Labtest Diagnóstica S. A., Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. As seguintes metodologias colorimétricas foram empregadas: o cálcio foi avaliado pelo método da cresoltaleína (570 nm), o cloreto pelo método do tiocianato (470 nm), o

magnésio pelo método de magon sulfonado (505 nm) e o fosfato pelo método do fosfomolibdato (340 nm).

3.4.6 Determinação Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e H^+ -ATPase branquial e renal

O tecido branquial e renal médio-posterior foi homogeneizado em tampão SEID 0,5% (Sacarose 150mM, EDTA dissódico 10mM, Imidazol 50mM, deoxicolato de sódio 0,1%). As atividades da Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e H^+ -ATPase foram mensuradas em meio de reação composto por Imidazol 30mM, NaCl 45mM, KCl 15mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3mM, KCN 0,4mM, 1.0mM de ATP, 0,2mM de NADH, 3IU/ml de PK, 2IU/ml de LDH, 0,1mM de Frutose-1,6-Difosfato e 2mM de PEP. As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços, em quadruplicatas (GIBBS; SOMERO, 1989 modificado por KÜLTZ; SOMERO, 1995). Nas 4 primeiras réplicas foi adicionado somente o meio de reação, sem inibidores. Nas próximas 4 foi adicionado o meio de reação contendo 2mM de ouabaína (inibidor da Na^+/K^+ -ATPase). Nas 4 últimas réplicas foi adicionado NEM (inibidor da H^+ -ATPase). A leitura foi realizada em absorbância de 340 nm na temperatura 20°C.

3.5 Análises estatísticas

Primeiramente uma análise Univariada de Variância (ANOVA), foi aplicada à resposta dos diversos biomarcadores com distribuição paramétrica, para verificar diferença entre os grupos submetidos à variação de temperatura e tempo (ANDERSON, 2001). Para tanto, as unidades amostrais foram agrupadas em 2 fatores (fator tempo: 9, 13, 17 e 21 dias de experimento; fator temperatura: controle (0°C) e experimental (2, 4, 6 e 8°C). Para os biomarcadores com distribuição não paramétrica foi aplicada a análise de Kruskal Wallis com agrupamento semelhante ao realizado para a ANOVA. Essas análises foram realizadas no pacote vega da plataforma R (DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013). Diferenças significativas foram consideradas quando $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

Todos os animais sobreviveram ao longo de 21 dias em todas as temperaturas (0, 2, 4, 6 e 8°C). As análises de variância mostraram que entre os biomarcadores testados, alguns apresentaram diferenças significativas sendo influenciados pelos fatores temperatura ou tempo, bem como pela interação entre os dois fatores (Tabela 1).

4.1 Análises de variância de biomarcadores do metabolismo oxidativo, tióis não-protéicos e marcadores de danos de estresse oxidativo

Nas brânquias de *N. rossii* os biomarcadores enzimáticos CAT ($F=10.94$, $p=0.012$), GR ($F=13.09$, $p=0.0044$), GPx ($F=11.52$, $p=0.0092$), GST ($F=21.91$, $p=1.0^{-4}$) e SOD ($F=10.67$, $p=0.0136$) foram alterados pelo tempo enquanto que a temperatura alterou somente a GPx ($F=4.2$, $p=0.04$). A interação do tempo e temperatura, influenciou apenas o biomarcador GST ($F=8.37$, $p=0.038$). Os tióis não protéicos ($F=9.07$, $p=0.0283$) foram alterados pelo fator tempo, bem como os marcadores de danos LPO ($F=6.48$, $p=0.0014$) e PCO ($F=5.97$, $p=0.0022$) (Tabela 1).

No rim de *N. rossii* os biomarcadores GR, GST, LPO e PCO não foram influenciados pelo tempo, temperatura ou pela interação entre os dois. O tempo influenciou os biomarcadores CAT ($F=26.87$, $p=0$), GPx ($F=3.9$, $p=0.0145$) e SOD ($F=27.67$, $p=0$). A GPx ($F=4.29$, $p=0.043$) também foi influenciada pelo fator temperatura enquanto a interação entre tempo e temperatura influenciou apenas os tióis não protéicos ($F=8.52$, $p=0.0363$) (Tabela 1).

No fígado de *N. rossii* os biomarcadores enzimáticos CAT ($F=12.28$, $p=0.0065$), GPx ($F=18.07$, $p=4^{-4}$), GST ($F=37.56$, $p=6.0^{-4}$) e SOD ($F=12.96$, $p=0.0047^{-4}$) sofreram influência do tempo, enquanto que a GR não sofreu alteração pelo tempo, temperatura ou de sua interação. Para os marcadores de danos a temperatura influenciou a LPO ($F=13.83$, $p=2.0^{-4}$) e a PCO ($F=13.71$, $p=2.0^{-4}$). O tempo isoladamente também influenciou a PCO ($F=8.29$, $p=0.0402$) enquanto a interação entre tempo e temperatura influenciou apenas os tióis não protéicos ($F=19.26$, $p=2.0^{-4}$) (Tabela 1).

No encéfalo de *N. rossii* os biomarcadores CAT ($F=38.63$, $p=0$), GPx ($F=38.65$, $p=0$), GR ($F=38.92$, $p=0$), GST ($F=37.56$, $p=0$) e SOD ($F=36$, $p=0$) foram influenciados pelo tempo. O fator temperatura isoladamente não influenciou nenhum dos biomarcadores analisados. O marcador de dano LPO não sofreu influência de tempo, temperatura ou da interação de ambos. A interação entre tempo e temperatura influenciou apenas os tióis não protéicos ($F=10.14$, $p=0.0174$) (Tabela 1).

TABELA 1 – RESULTADOS DAS ANÁLISES UNIVARIADAS NAS RESPOSTAS DE BIOMARCADORES DO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES *Nothotenia rossii*

	CATALASE			GPx			GR			GST			LPO			GSH			SOD			PCO		
	F	p		F	p		F	p		F	p		F	p		F	p		F	p		F	p	
BRÂNQUIAS	Temperatura	2,5517	0,1102	4,2033	0,0403*		2,00E-04	0,99		2,00E-04	0,99		0,9771	0,3299		0,0078	0,9298		0,0837	0,7724		0,6243	0,4349	
	Tempo	10,9426	0,012*	11,5291	0,0092*		13,0989	0,0044*		21,9181	1,00E-04*		6,4838	0,0014*		9,0723	0,0283*		10,676	0,0136*		5,9755	0,0022*	
	Tempo*Temp	0,5012	0,9186	0,9523	0,8128		0,9113	0,8227		8,3779	0,0388*		1,1674	0,3365		0,4381	0,9323		5,5983	0,1329		2,5107	0,0751	
ENCÉFALO	Temperatura	0,5908	0,4421	0,0218	0,8828		0,5	0,4795		0,2924	0,5887		0,0108	0,9173		0,4647	0,4954		1,4705	0,2253		-	-	
	Tempo	38,6377	0*	38,6574	0*		38,9289	0*		37,5634	0*		4,655	0,1989		4,0875	0,2522		36,0027	0*		-	-	
	Tempo*Temp	4,8482	0,1833	4,0115	0,2602		5,3697	0,1466		5,8832	0,1174		2,2301	0,526		10,1476	0,0174*		5,0532	0,1679		-	-	
FÍGADO	Temperatura	0,0596	0,8071	0,0963	0,7563		2,7534	0,104		2,3472	0,1255		13,8375	2,00E-04*		0,092	0,7617		0,0097	0,9217		13,7154	2,00E-04*	
	Tempo	12,2812	0,0065*	18,0768	4,00E-04*		0,2	0,8959		17,3018	6,00E-04*		2,2046	0,5311		2,0403	0,5641		12,964	0,0047*		8,2991	0,0402*	
	Tempo*Temp	1,8769	0,5984	1,2115	0,7503		0,9839	0,4088		3,7848	0,2857		5,7624	0,1238		19,2668	2,00E-04*		3,5516	0,3141		4,1187	0,2489	
RIM	Temperatura	1,3107	0,2523	4,293	0,0439*		0,8574	0,3545		0,2185	0,6402		0,0897	0,7659		0,1995	0,6551		0,8118	0,3676		0,4786	0,4891	
	Tempo	26,8713	0*	3,9001	0,0145*		5,5552	0,1354		4,5472	0,2081		0,3875	0,7625		1,1769	0,7586		27,6708	0*		2,8935	0,4083	
	Tempo*Temp	0,4236	0,9353	0,898	0,4494		2,1055	0,5508		3,381	0,3365		0,075	0,9731		8,525	0,0363*		2,1138	0,5491		0,6091	0,8944	

LEGENDA: *N. rossii* quando submetido ao aumento gradual de temperatura (05 °C/dia até alcançar as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C e 8 °C), tempo (T9, T13, T17, T21) e sua interação nas respostas de biomarcadores do metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes, GPx – Glutathione peroxidase; GR- Glutathione reductase; GST- Glutathione-S-Transferase; LPO- Lipoperoxidação; GSH – glutathione; SOD- Superóxido dismutase e PCO – Carbonilação protéica, nos tecidos branquial, encefálico, hepático e renal de *N. rossii*. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$.

4.2 Níveis de atividade de enzimas antioxidantes

Nas brânquias de *N. rossii* não houve alteração nos níveis de atividade da CAT (Figura 1a) e SOD (Figura 1e) quando comparados com seus respectivos grupos controle em cada temperatura experimental alcançada e entre os diferentes tempos experimentais. Para a CAT os grupos experimental e controle em 13 dias diminuíram em relação aos grupos experimental e controle em 21 dias. Para a SOD, os grupos experimental e controle em 13 e 17 dias diminuíram em relação aos grupos experimental e controle em 21. O nível de atividade da GPx (Figura 1b) aumentou no grupo controle e experimental em 9 dias quando comparado aos grupos controle e experimental em 13 e 21 dias.

O nível de atividade da GR branquial (Figura 1c) aumentou no grupo controle em 21 dias (0°C) quando comparado aos demais grupos controle (9, 13 e 17 dias), bem como nos experimentais. O nível de atividade da GST (Figura 1d) aumentou no grupo experimental em 9 dias (2 °C) quando comparado a seu respectivo grupo controle (0°C) e aos grupos experimentais em 13 e 17 dias (4 e 6°C, respectivamente). O grupo controle em 21 dias (0°C) apresentou nível de atividade da GST aumentado quando comparado com os demais grupos controle dos outros tempos experimentais (9, 13 e 17 dias).

Nos rins de *N. rossii* não houve alteração nos níveis de atividade da SOD (Figura 2e), GR (Figura 2c) e GST (Figura 2d) quando comparadas com seu respectivo grupo controle em todas as temperaturas testadas (2°C, 4°C, 6°C e 8°C) e entre os tempos experimentais (9,13,17 e 21 dias). O nível de atividade da CAT (Figura 2a) aumentou no grupo controle em 17 dias (6 °C) quando comparada com os demais grupos controle em 9,13 e 21 dias (2 °C, 4 °C e 8 °C). Os níveis de atividade da GPx (Figura 2b) aumentaram no grupo controle em 17 dias (6 °C) quando comparados ao grupo controle em 13 dias (4 °C).

No fígado de *N. rossii* não houve alteração no nível de atividade da GR (Figura 3c) quando comparada com seu respectivo grupo controle (2°C, 4°C, 6°C e 8°C) e entre os tempos experimentais (9,13,17 e 21 dias). O nível de atividade da CAT (Figura 3a) foi maior em 9 dias (0°C) quando comparado aos tempos experimentais de 17 e 21 dias.

O nível de atividade da GPx (Fig. 3b) hepática foi maior em 17 dias (6 °C) quando comparado com os tempos de 9, 13 e 21 dias (2 °C, 4 °C e 8 °C).

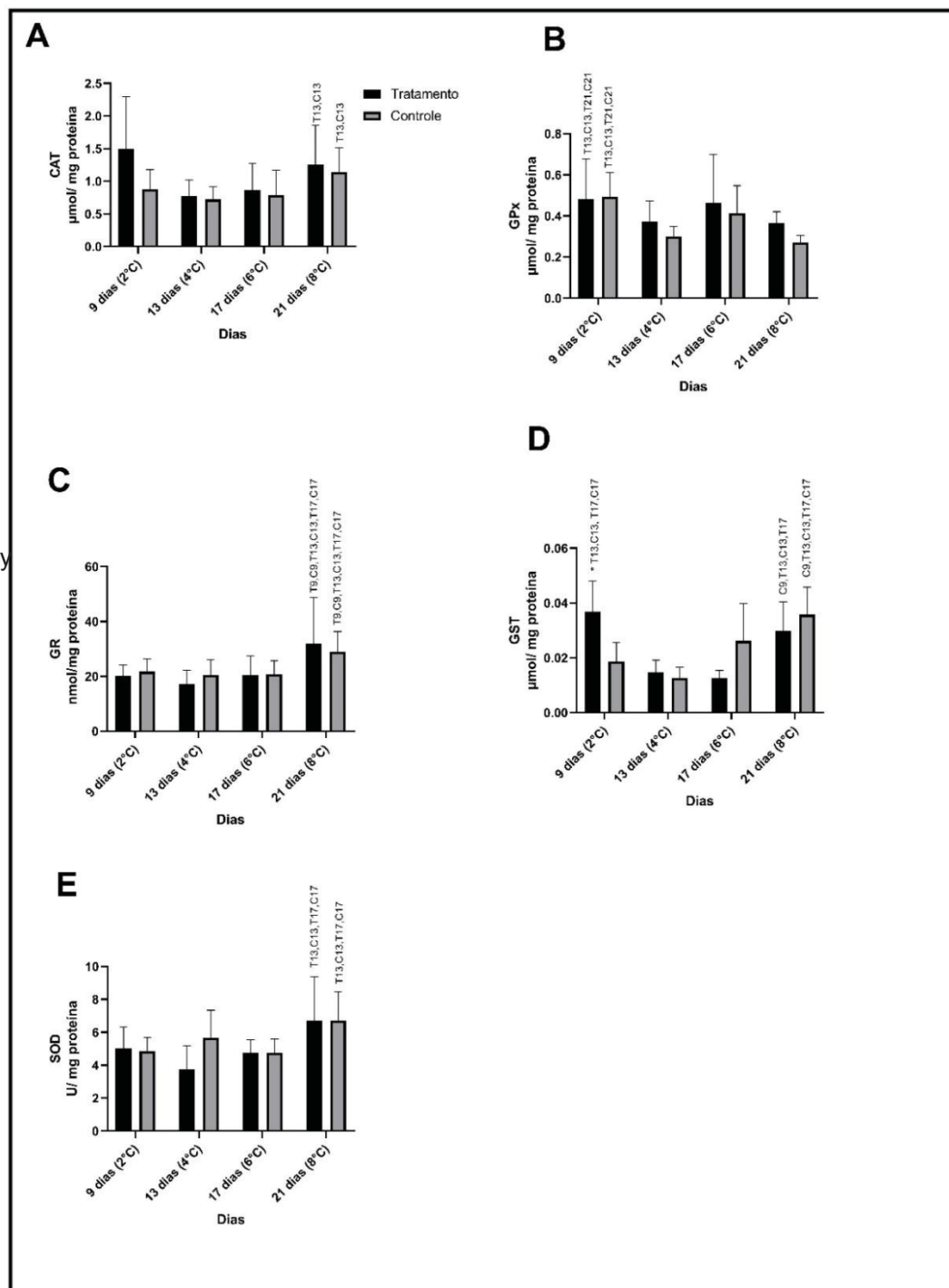
O nível de atividade da GST hepática (Figura 3d) foi menor nos grupos controle e experimental em 21 dias quando comparado a grupos controle e experimental dos outros tempos experimentais (9, 13, 17 e 21 dias). O nível de atividade da SOD (Figura 3e) foi maior nos grupos controle e experimental em 9 dias quando comparado a grupos controle e experimental em 13 e 17 dias.

No encéfalo de *N. rossii* o nível de atividade da GR (Figura 4c) diminuiu em 21 dias quando comparado aos grupos controle e experimental dos outros tempos experimentais (9, 13 e 17 dias). O nível de atividade da CAT (Figura 4a) foi maior em 9 dias (0 °C) quando comparado aos grupos controle de 13, 17 e 21 dias.

O nível de atividade da GPx encefálica (Figura 4b) diminuiu no grupo controle e experimental em 21 dias (0 °C) comparado aos grupos controle e experimental em 9 dias. Os níveis de atividade da SOD (Figura 4e) aumentaram nos grupos controle e experimental em 9 dias (0 °C) quando comparado aos demais grupos controle e experimental em 13 e 17 dias. Em 21 dias, nos grupos controle e experimental o nível de atividade da SOD diminuiu comparado aos grupos controle e experimental dos outros tempos experimentais (9, 13 e 17 dias).

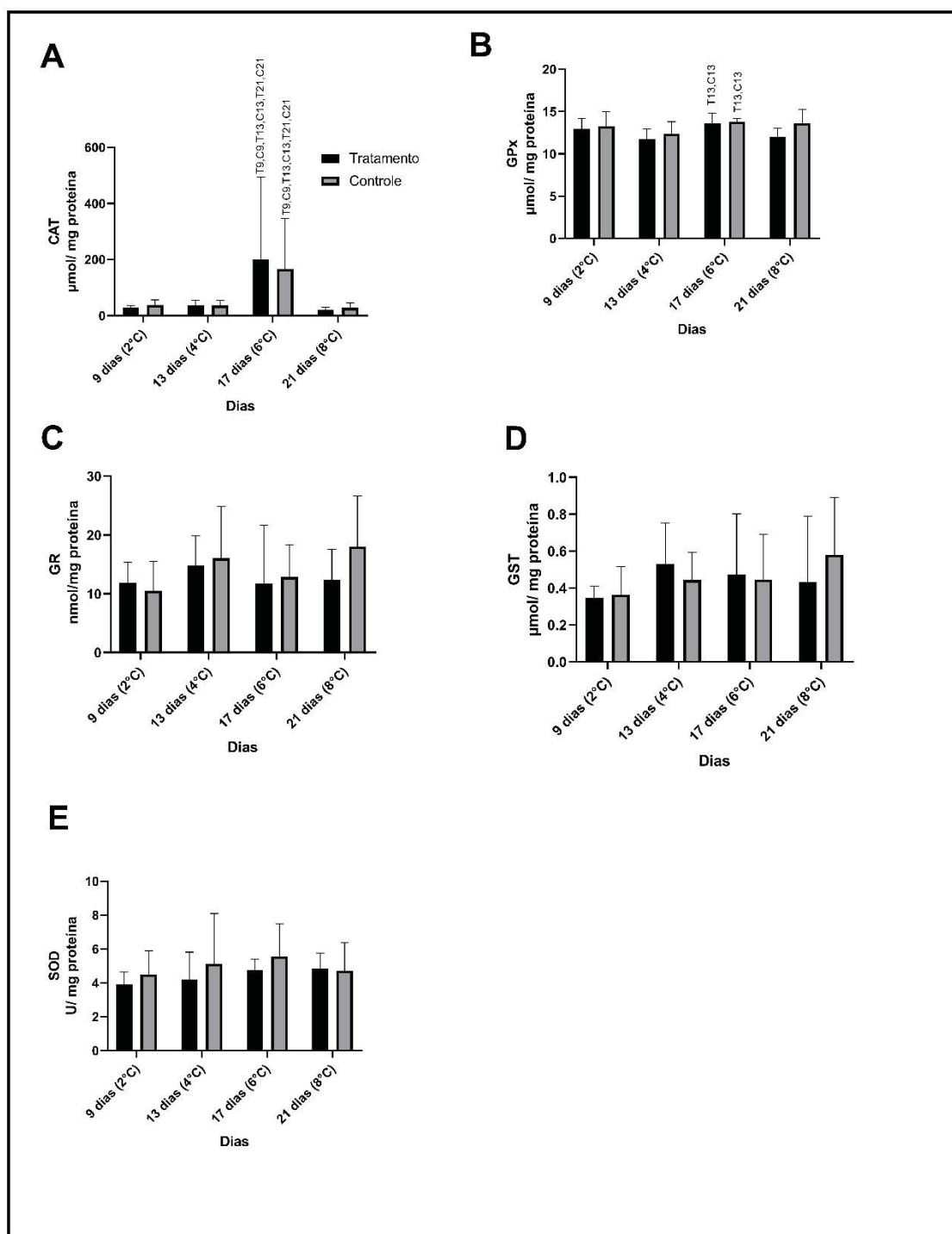
O nível de atividade da GST encefálica (Fig. 4d) diminuiu nos grupos controle e experimental em 21 dias (quando comparado aos demais grupos controle e experimental em 9 e 17 dias de experimento).

FIGURA 1- NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO BRANQUIAL EM *Nothotenia rossii*



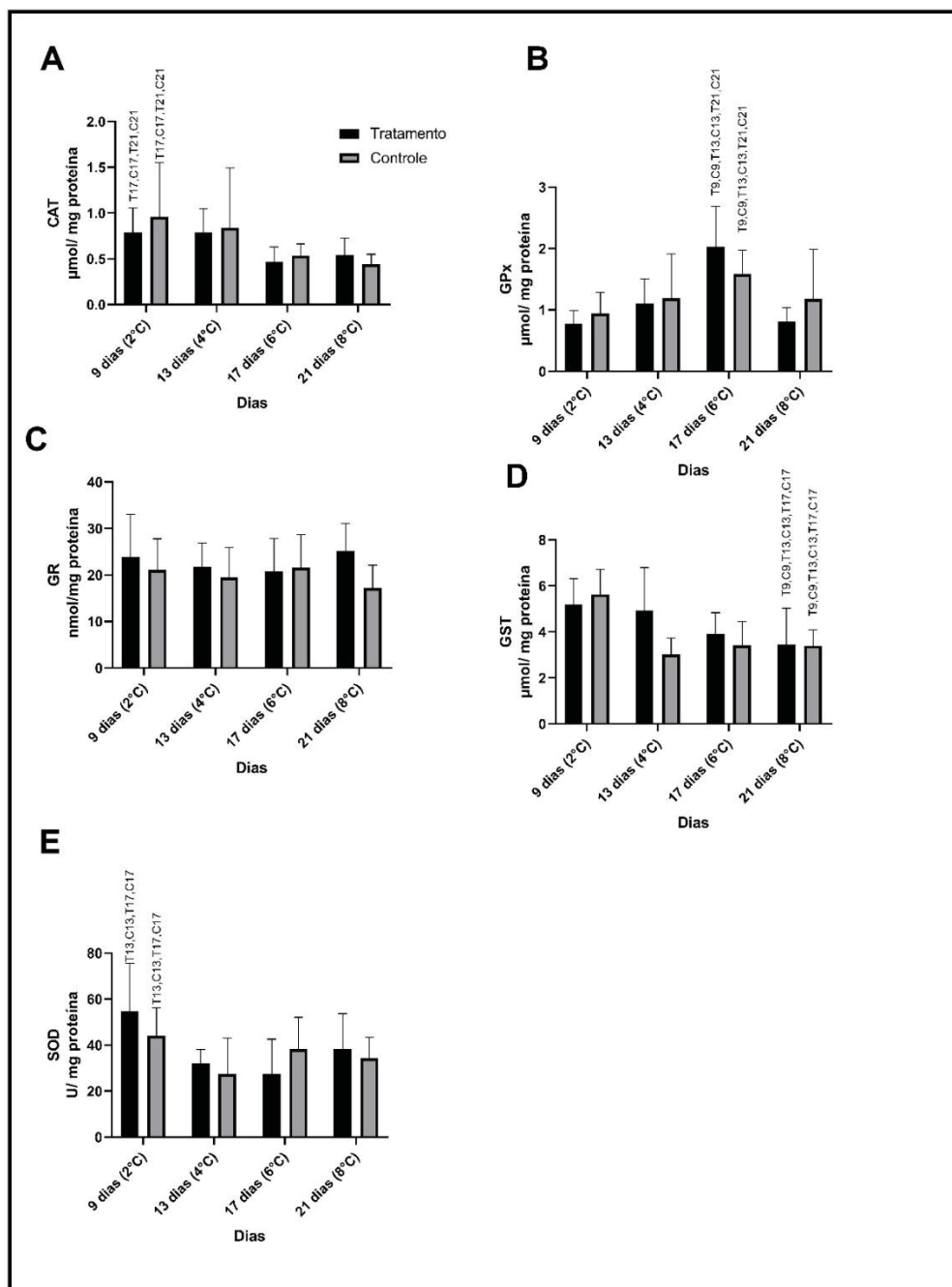
LEGENDA: *N. rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem alcançadas. Catalase, CAT; Glutathione peroxidase, GPx; Glutathione redutase, GR; Glutathione-S-Transferase, GST; Superóxido dismutase, SOD. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. **C=controle T=tratamento

FIGURA 2- NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO RENAL EM *Nothotenia rossii*



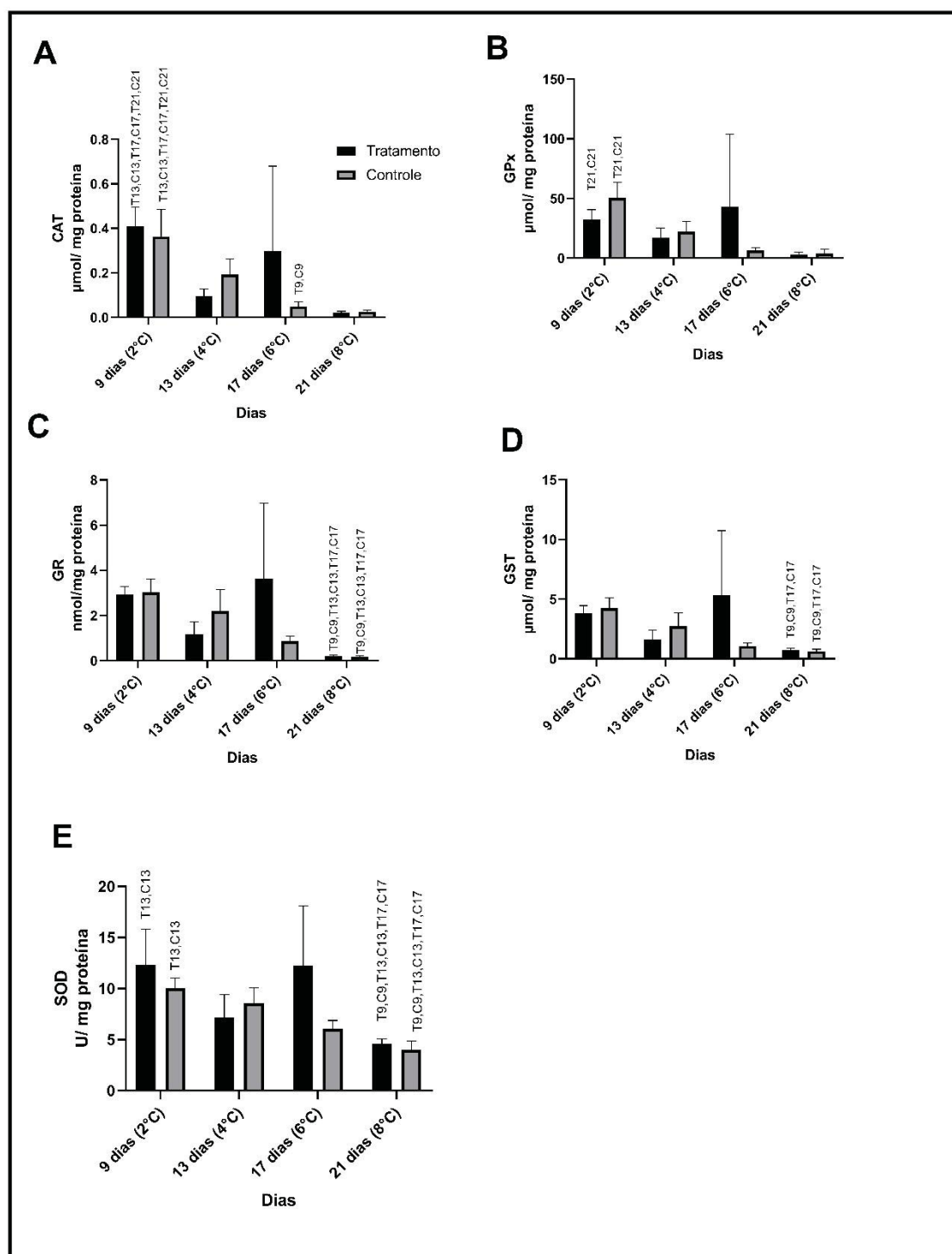
LEGENDA: *N. rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem alcançadas. Catalase, CAT; Glutathione peroxidase, GPx; Glutathione redutase, GR; Glutathione-S-Transferase, GST; Superóxido dismutase, SOD. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. **C=controle T=tratamento

FIGURA 3- NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO HEPÁTICO EM *Nothotenia rossii*



LEGENDA: *N. rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem alcançadas. Catalase, CAT; Glutathiona peroxidase, GPx; Glutathiona redutase, GR; Glutathiona-S-Tranferase, GST; Superóxido dismutase, SOD. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. **C=controle T= tratamento

FIGURA 4- NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO ENCEFÁLICO EM *Nothotenia rossii*



LEGENDA: *N. rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura ($0,5^{\circ}\text{C}/\text{dia}$), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8°C fossem alcançadas. Catalase, CAT; Glutathiona peroxidase, GPx; Glutathiona redutase, GR; Glutathiona-S-Tranferase, GST; Superóxido dismutase, SOD. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. **C=controle T= tratamento

4.3 Concentração dos níveis de marcadores de danos oxidativos e tióis não protéicos

Nas brânquias de *N. rossii* a LPO (Figura 5b), aumentou nos grupos controle e experimental em 21 dias quando comparada aos demais grupos controles experimental nos demais tempos experimentais (9, 13 e 17 dias). Não houve diferença da LPO entre os grupos experimentais e controle. A PCO (Figura 5a) diminuiu no grupo controle em 13 dias (0 °C), quando comparada aos grupos controle em 9 e 21 dias. Não houve diferença significativa da PCO entre os grupos experimentais e controle.

Nas brânquias a concentração de glutathiona e de outros tióis não protéicos (Figura 5c) aumentou nos grupos controle e experimental em 21 dias quando comparado aos grupos controle e experimental em 13 dias. Não houve variação significativa de tióis não protéicos entre os grupos experimentais e controle.

Nos rins de *N. rossii* os níveis de LPO (Figura 6a) e de PCO (Figura 6b) não sofreram alteração quando comparados com seu respectivo grupo controle (2°C, 4°C, 6°C e 8°C) e entre os diferentes tempos experimentais (9,13,17 e 21 dias).

Nos rins, a concentração de glutathiona e outros tióis não protéicos (Figura 6c) aumentou no grupo experimental em 17 dias (6 °C) quando comparada com os grupos experimentais em 13 e 21 dias (4 °C e 8 °C). Não houve alteração significativa de glutathiona e outros tióis não protéicos entre os grupos controle e experimental.

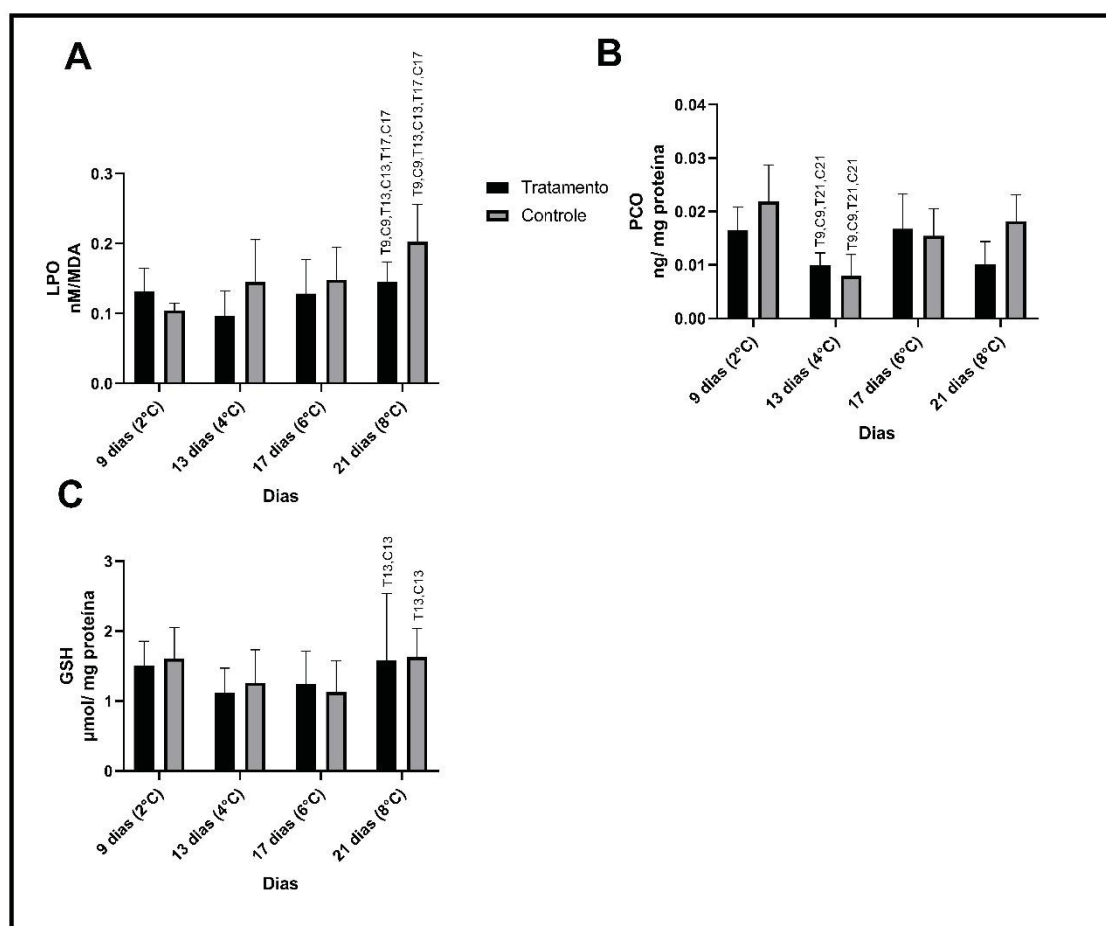
No fígado de *N. rossii* os níveis de LPO (Figura 7a) aumentaram em todas as temperaturas atingidas (2, 4, 6 e 8 °C), após 9,13, 17 e 21 dias de aclimação, quando comparadas ao respectivo grupo controle (0 °C). Não houve alteração nos níveis de PCO entre os grupos controle e experimental (Figura 7b) e entre os diferentes tempos experimentais (9, 13, 17 e 21).

No fígado, a concentração de glutathiona e outros tióis não protéicos (Figura 7c) aumentou no grupo experimental em 9 dias (2 °C) quando comparado ao seu grupo controle. O grupo experimental em 21 dias (8 °C) apresentou concentração menor quando comparado com os grupos experimentais em 9 e 17 dias (2 °C e 6 °C). O grupo controle em 17 dias (0 °C)

apresentou concentração maior de tióis não protéicos quando comparado ao grupo controle em 9 dias

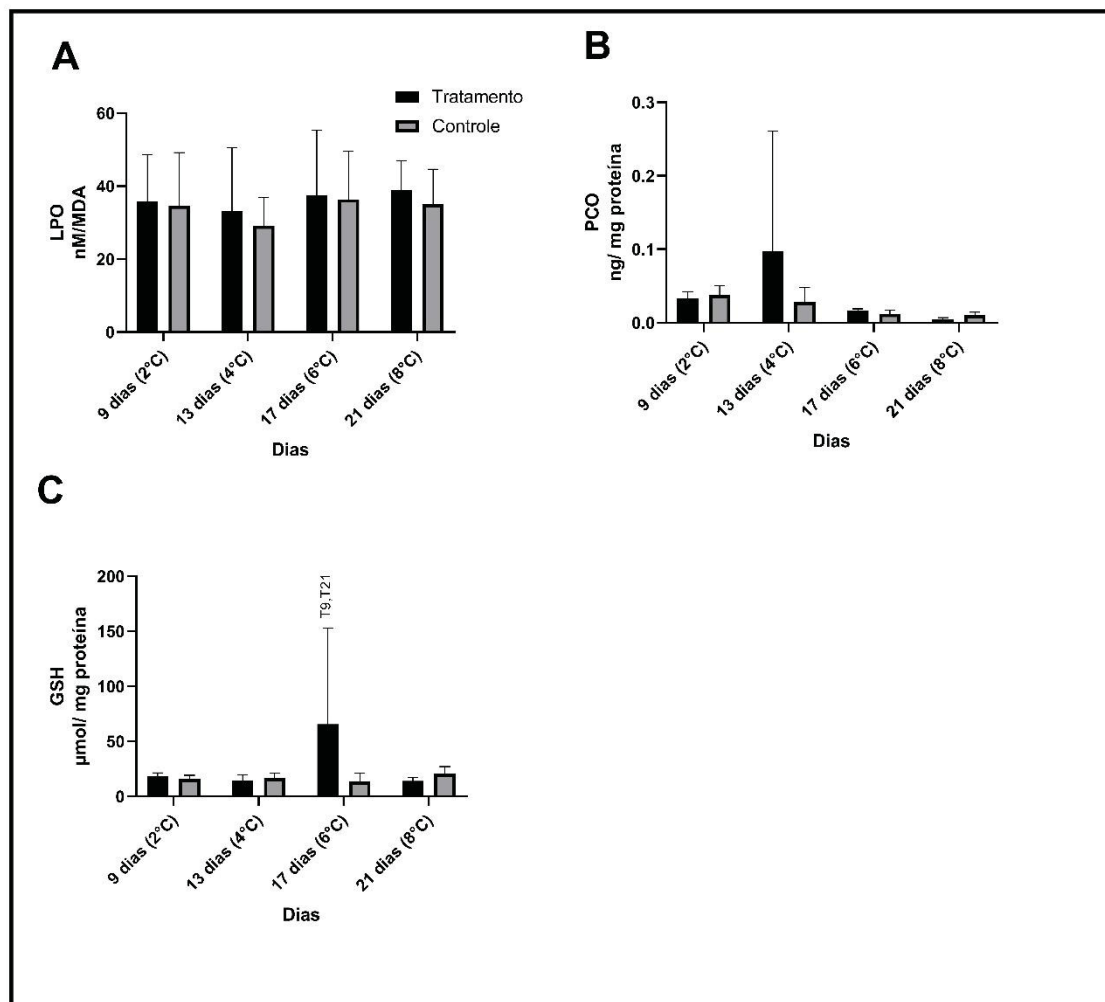
No encéfalo não houve alteração nos níveis de LPO (Figura 8a) e na concentração de glutatona e outros tióis não protéicos (Figura 8b) entre os grupos controle e experimental e entre os diferentes tempos experimentais (9, 13, 17 e 21 dias).

FIGURA 5 – CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS CELULARES E TIÓIS NÃO PROTÉICOS (GSH) NO TECIDO BRANQUIAL EM *Nothotenia rossii*



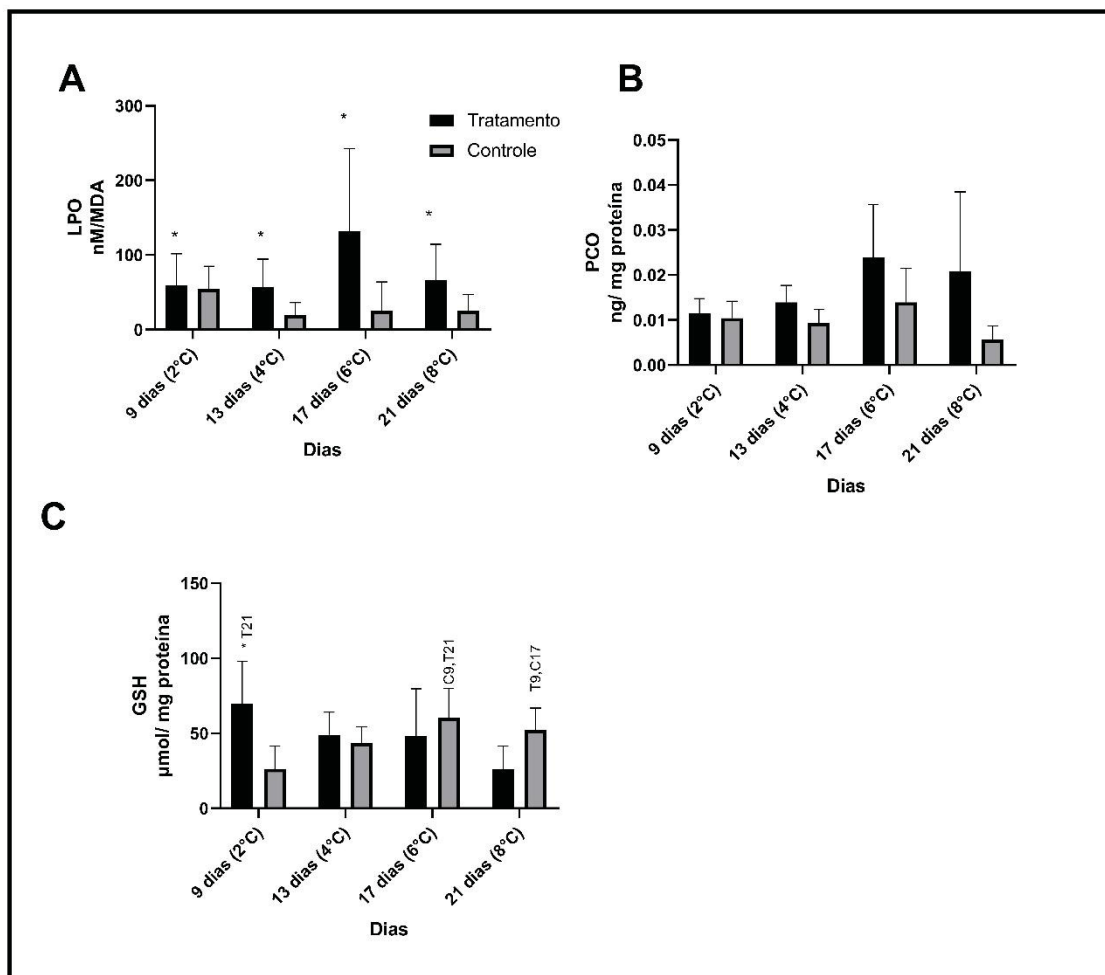
LEGENDA: *N. rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem alcançadas. PCO-Carbonilação protéica; LPO-Lipoperoxidação e GSH- glutatona e outros tióis não protéicos. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. **C=controle T=tratamento

FIGURA 6 – CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS CELULARES E TIÓIS NÃO PROTÉICOS (GSH) NO TECIDO RENAL EM *Nothotenia rossii*



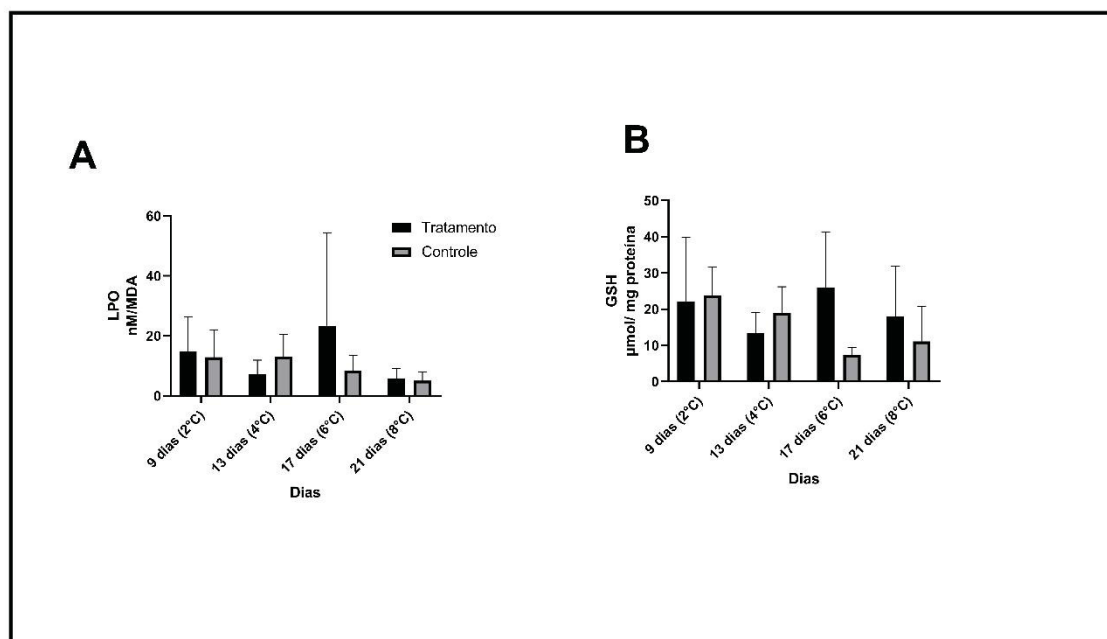
LEGENDA: *N. rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem alcançadas. PCO-Carbonilação protéica; LPO-Lipoperoxidação e GSH- glutationa e outros tióis não protéicos. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. **C=controle T=tratamento

FIGURA 7 – CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS CELULARES E TIÓIS NÃO PROTÉICOS (GSH) NO TECIDO HEPÁTICO EM *Nothotenia rossii*



LEGENDA: *N. rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem alcançadas. PCO-Carbonilação protéica; LPO-Lipoperoxidação e GSH- glutationa e outros tióis não protéicos. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. **C=controle T=tratamento

FIGURA 8 – CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS CELULARES E TIÓIS NÃO PROTÉICOS (GSH) NO TECIDO ENCEFÁLICO EM *Nothotenia rossii*



LEGENDA: *N. rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem alcançadas. PCO-Carbonilação protéica; LPO-Lipoperoxidação e GSH- glutationa e outros tióis não protéicos. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. **C=controle T=tratamento

4.4 Análises de variância de biomarcadores plasmáticos

No plasma de *N. rossii* os íons cálcio ($F=17.07$, $p=7.0^{-4}$), cloreto ($F=7.45$, $p=4.0^{-4}$), fósforo ($F=4.01$, $p=0,013$) e magnésio ($F=16.86$, $p=9.0^{-4}$) foram influenciados pelo fator tempo (Tabela, 2). Para os parâmetros metabólicos do plasma o tempo influenciou a albumina ($F=14.77$, $p=0.002$), colesterol ($F=23.89$, $p=0$), lactato ($F=11.67$, $p=0.0086$), glicose ($F=7.96$, $p=0.0467$) e LDH ($F=12.24$, $p=0.0066$) (Tabela 3). Os biomarcadores proteína total ($F=9.17$, $p=0.0025$), globulina ($F=10.43$, $p=0.0012$) e LDH ($F=6.52$, $p=0.0106$) sofreram influência da temperatura (Tabela 3). Os triglicérides e o cortisol não sofreram influência do tempo, temperatura ou da interação entre os dois (Tabela 3). A interação entre tempo e temperatura não influenciou nenhum biomarcador (Tabelas 2 e 3).

TABELA 2 – RESULTADOS DAS ANÁLISES UNIVARIADAS NAS RESPOSTAS DOS ÍONS PLASMÁTICOS EM *Nothotenia rossii*

		CÁLCIO		CLORETOS		FÓSFORO		MAGNÉSIO	
		F	p	F	p	F	p	F	p
PLASMA	Temperatura	0,1408	0,7075	1,7934	0,1874	0,2435	0,6242	1,5947	0,2067
	Tempo	17,0775	7,00E-04*	7,4512	4,00E-04*	4,0186	0,013*	16,8669	8,00E-04*
	Tempo*Temp	2,8091	0,422	1,1079	0,3561	1,3265	0,2779	5,501	0,1386

LEGENDA: *N. rossii* sob os efeitos do aumento gradual de temperatura (05 °C/dia até alcançar as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C e 8 °C), tempo (T9, T13, T17, T21) e sua interação nas respostas dos íons plasmáticos, cálcio, cloretos, fósforo e magnésio* indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$

TABELA 3 – RESULTADOS DAS ANÁLISES UNIVARIADAS NAS RESPOSTAS DE PARÂMETROS METABÓLITOS PLASMÁTICOS EM *Nothotenia rossii*

		PROTEÍNA TOTAL		TRIGLICÉRIDES		LACTATO		CORTISOL		LDH		GLOBULINA		GLICOSE		ALBUMINA		COLESTEROL	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
PLASMA	Temperatura	9,1743	0,0025*	1,8095	0,1786	0,5345	0,4647	1,0999	0,9033	6,5275	0,0106*	10,4344	0,0012*	0,6193	0,4313	0,343	0,5581	1,6412	0,2002
	Tempo	3,0824	0,3791	1,7689	0,6217	11,6749	0,0086*	0,8926	0,8272	12,2455	0,0066*	0,6735	0,8794	7,9649	0,0467*	14,7784	0,002*	23,895	0*
	Tempo*Temp	1,5934	0,6609	0,4698	0,9255	2,8336	0,418	7,7299	0,0519	5,5085	0,1381	3,7948	0,2845	5,1348	0,1622	4,6219	0,2017	4,0081	0,2606

LEGENDA: *N. rossii* sob os efeitos do aumento gradual de temperatura (05 °C/dia até alcançar as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C e 8 °C), tempo (T9, T13, T17, T21) e sua interação nas respostas dos parâmetros plasmáticos proteínas totais; triglicerídeos; lactato; cortisol; a enzima lactato desidrogenase, LDH; globulinas, glicose, albumina e colesterol de *N. rossii*. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$

4.5 Concentração do cortisol plasmático

No plasma de *N. rossii* a concentração de cortisol (Figura 9c) não sofreu alteração em nenhum grupo experimental quando comparados com seus respectivos grupos controle (2,4,6 e 8 °C) e entre os tempos experimentais (9,13,17 e 21 dias).

4.6 Concentração de parâmetros metabólicos do plasma

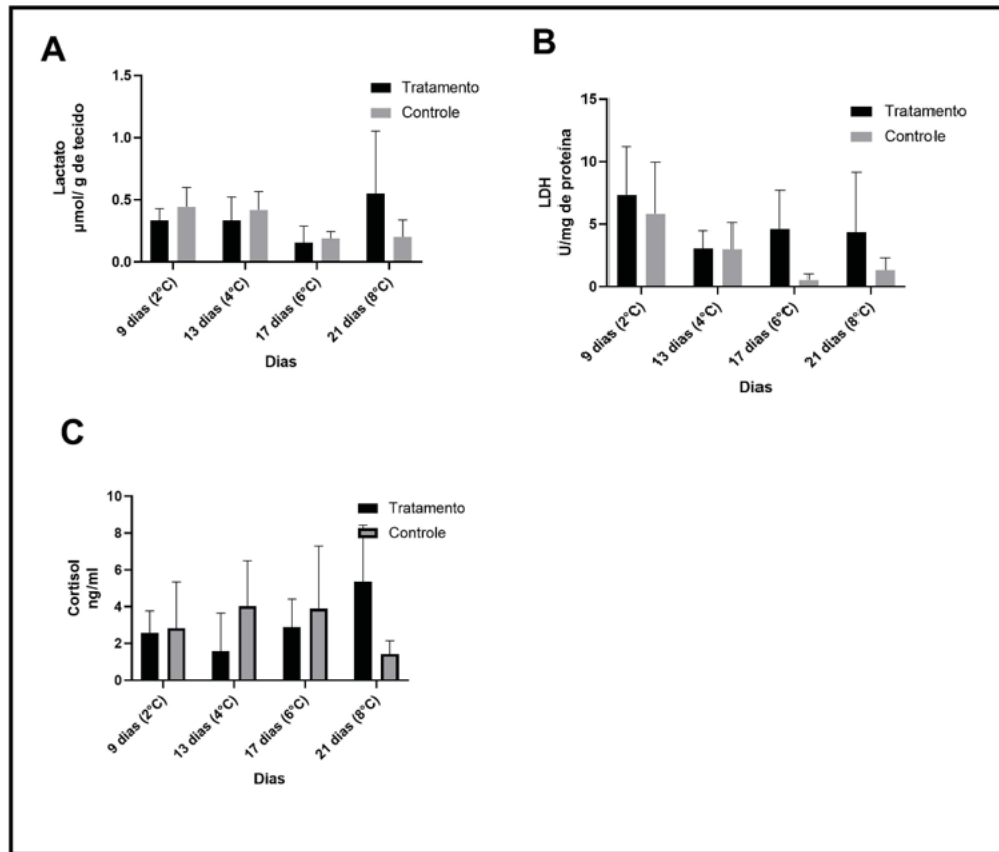
No plasma de *N. rossii* a concentração de albumina (Figura 10d) diminuiu nos grupos controle e experimental em 13 dias (4°C) quando comparado com os grupos controle e experimental em 17 e 21 dias (6 °C e 8 °C). Não houve alteração na concentração de albumina em nenhum grupo experimental quando comparados com seus respectivos grupos controle (2,4,6

e 8 °C) e entre os tempos experimentais (9,13,17 e 21 dias). A concentração de colesterol (Figura 10a) aumentou nos grupos controle em 17 e 21 dias (6°C e 8 °C), quando comparadas com os grupos controle em 9 e 13 dias (2 °C e 4 °C). Não houve alteração na concentração de colesterol em nenhum grupo experimental quando comparados com seus respectivos grupos controle (2,4,6 e 8 °C) e entre os tempos experimentais (9,13,17 e 21 dias).

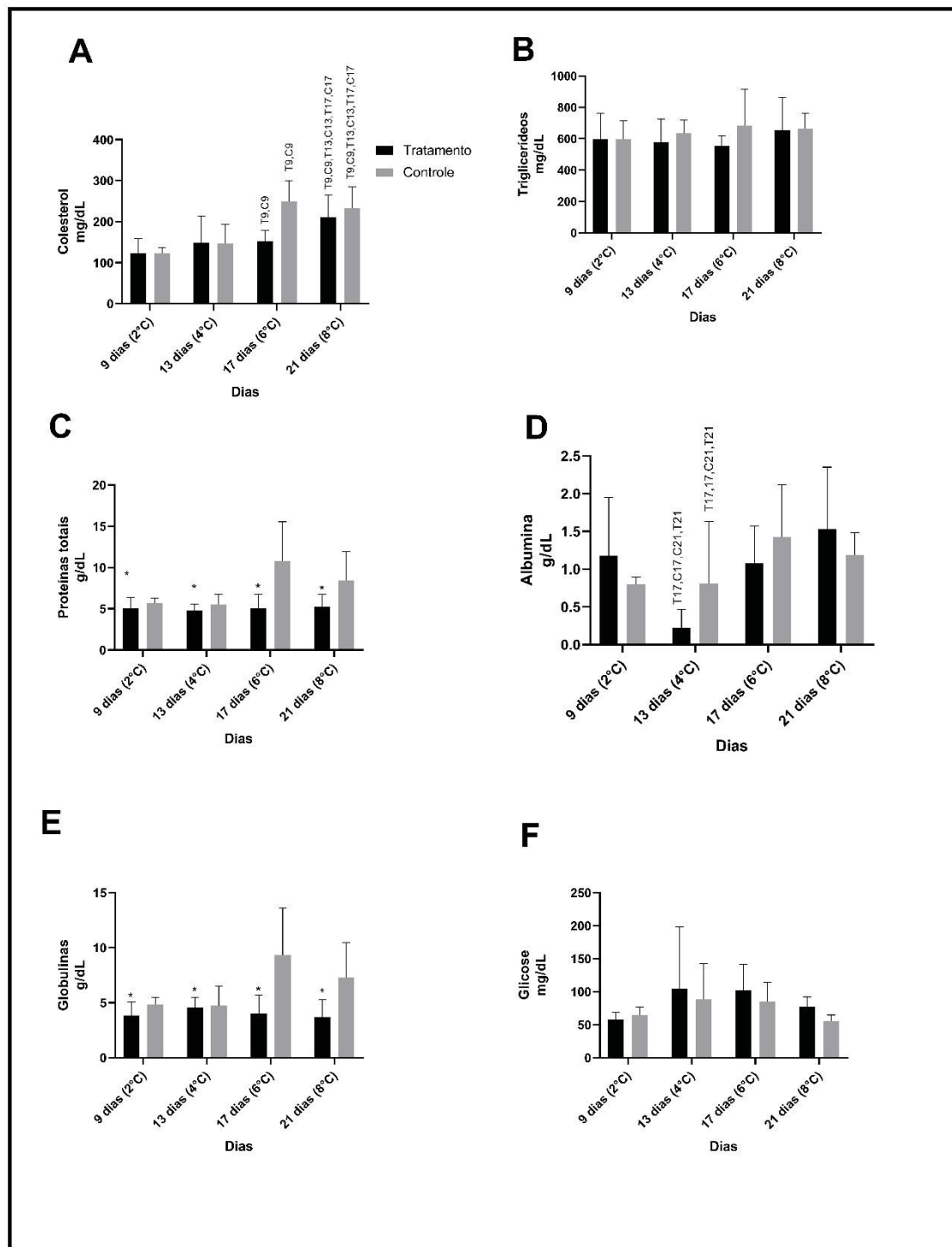
A concentração de glicose (Figura 10f), lactato (Figura 9a), e triglicérides plasmáticos (Figura 10b) não apresentaram diferenças entre grupo experimental quando comparados com seus respectivos grupos controle (2,4,6 e 8 °C) e entre os tempos experimentais (9,13,17 e 21 dias).

A concentração de globulina plasmática (Figura 10e) e proteínas totais (Figura 10c) diminuíram em todos os grupos experimentais (2,4,6 e 8 °C) quando comparados com seus respectivos grupos controle. Não houve diferença de globulina plasmática e proteínas totais quando os grupos foram comparados entre os tempos experimentais (9,13,17 e 21 dias).

Os níveis de atividade da LDH plasmática (Figura 9b) aumentou no grupo experimental em 9 dias (2 °C) quando comparada com os demais grupos experimentais em 13,17 e 21 dias (4,6 e 8 °C). Não houve diferença da LDH entre os grupos experimentais e respectivos controles (2,4,6 e 8 °C).

FIGURA 9- CONCENTRAÇÕES DE PARÂMETROS METABÓLICOS E DE DANOS NO PLASMA DE *Nothotenia rossii*

LEGENDA: Marcadores plasmáticos, lactato, lactato desidrogenase (LDH) e cortisol em *Nothotenia rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem alcançadas. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. **C=controle T=tratamento

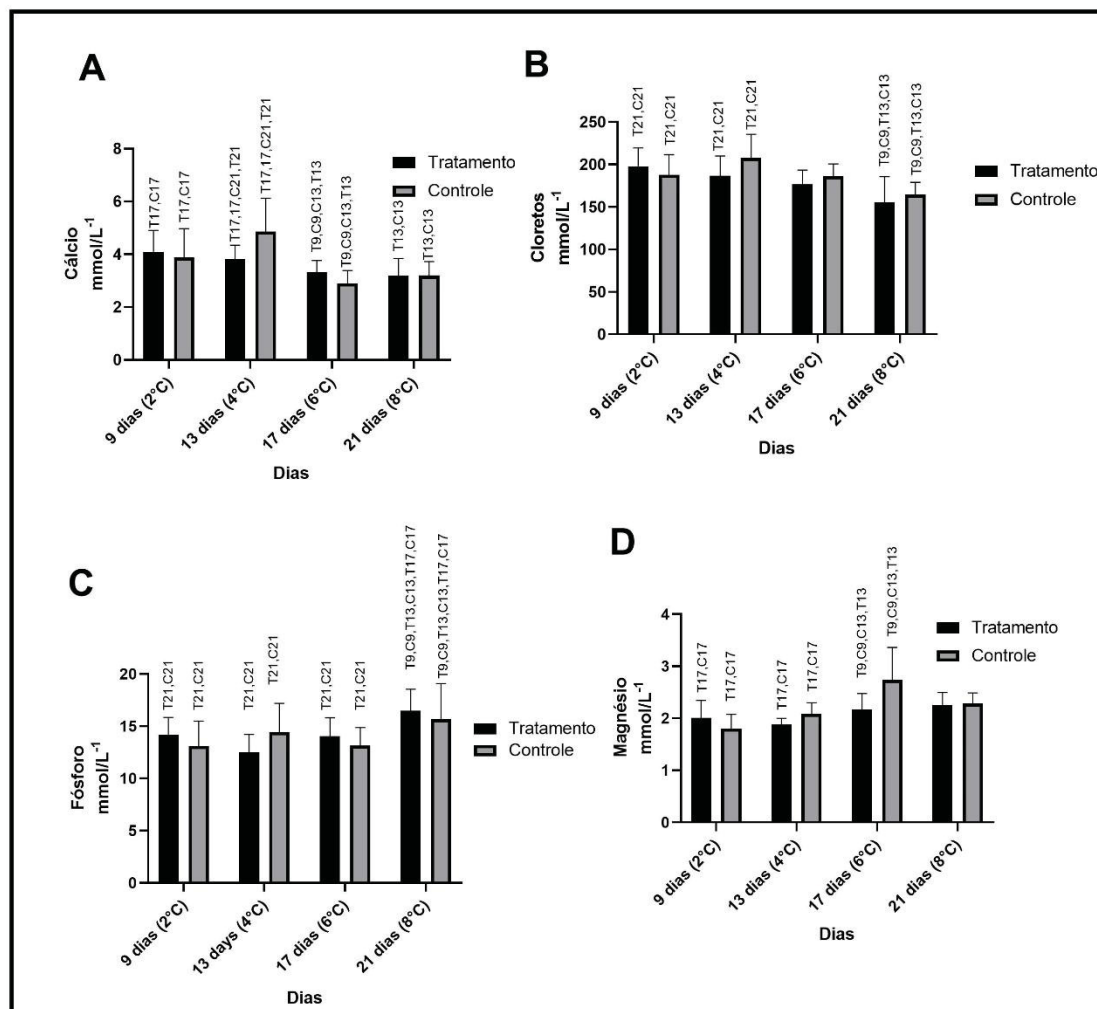
FIGURA 10- CONCENTRAÇÕES DE PARÂMETROS METABÓLICOS NO PLASMA DE *Nothotenia rossii*

LEGENDA: Concentração dos marcadores plasmáticos colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, globulinas e glicose em *Nothotenia rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem alcançadas. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. **C=controle T=tratamento

4.7 Concentração de parâmetros osmo-iônicos do plasma

Em *N. rossii* a concentração de cálcio plasmático (Figura 11a) aumentou nos grupos controle e experimental em 13 dias (4°C) quando comparadas com o grupo controle e experimental em 21 dias (8 °C). A concentração nos grupos controle e experimental em 17 dias diminuíram quando comparadas aos grupos controle e experimental em 9 (2 °C) e 13 dias (4 °C). Não houve diferença da concentração do cálcio entre os grupos experimentais e respectivos controles (2,4,6 e 8 °C). A concentração de cloreto plasmático (Figura 11b) diminuiu no grupo controle e experimental em 21 dias (8 °C) quando comparada com os grupos controle e experimental em 9 e 13 dias (2 °C e 4 °C). Não houve diferença de cloreto entre os grupos experimentais e respectivos controles (2,4,6 e 8 °C).

A concentração de fósforo plasmático (Figura 11c) aumentou no grupo controle e experimental em 21 dias quando comparada com os demais grupos controle e experimental em 9,13 e 17 dias (2,4 e 6 °C). Não houve diferença de fósforo entre os grupos experimentais e respectivos controles (2,4,6 e 8 °C). A concentração de magnésio plasmático (Figura 11d) aumentou no grupo controle e experimental em 17 dias (6 °C) quando comparada com os grupos controle e experimental em 9 e 13 dias (2 °C e 4 °C). Também não houve diferença de magnésio entre os grupos experimentais e respectivos controles (2,4,6 e 8 °C).

FIGURA 11- CONCENTRAÇÕES DE PARÂMETROS OSMO-IÔNICOS NO PLASMA DE *Nothotenia rossii*

LEGENDA: Concentração parâmetros osmo-iônicos cálcio, cloreto, fósforo e magnésio em *Nothotenia rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem alcançadas. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. **C=controle T=tratamento

4.8 Análises de variância das enzimas Na⁺/ K⁺ ATPase e H⁺-ATPase nos tecidos renal e branquial

Nas brânquias de *N. rossii* os níveis de atividade da Na⁺/ K⁺ ATPase ($F=7.9701$, $p=2.0^{-4}$) e H⁺-ATPase ($F=3.8672$, $p=0.0148$) foram influenciadas pelo fator tempo (Tabela 4). No rim a Na⁺/ K⁺ ATPase ($F=13.4066$, $p=0.0038$) e H⁺-ATPase ($F=14,4552$, $p=0.0023$) foram influenciadas pela interação entre os

fatores tempo e temperatura (Tabela 4). O fator tempo isoladamente não influenciou os níveis de atividade da Na^+/K^+ ATPase e H^+ -ATPase (Tabela 4)

TABELA 4 – RESULTADOS DAS ANÁLISES UNIVARIADAS EM RESPOSTAS DAS ENZIMAS OSMORREGULATÓRIAS Na^+/K^+ ATPase e H^+ ATPase

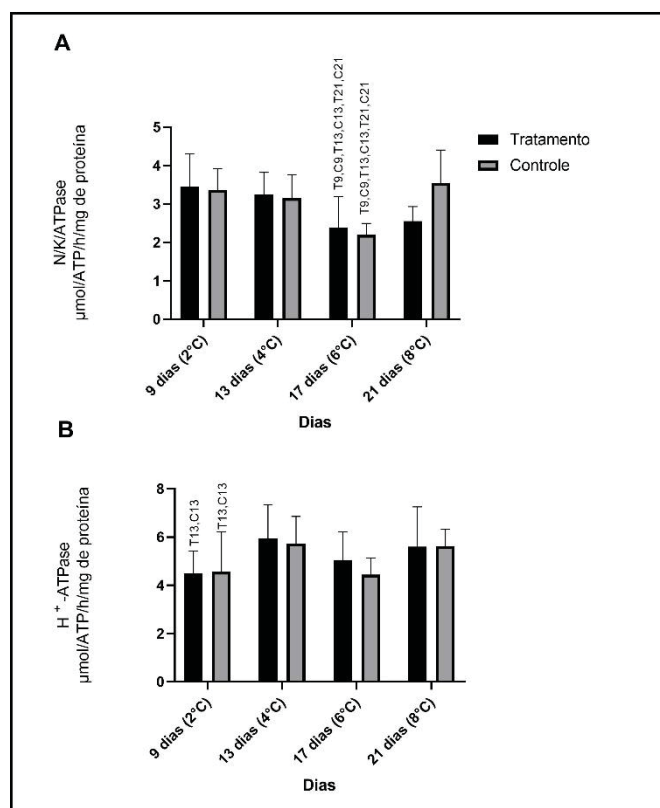
		Na^+/K^+ ATPase		H^+ -ATPase	
		F	p	F	P
BRÂNQUIAS	Temperatura	0,0019	0,3757	0,2741	0,6031
	Tempo	7,9701	2,00E-04*	3,8672	0,0148*
	Tempo*Temp	2,5853	0,064	0,2248	0,8787
RIM	Temperatura	0,3104	0,5774	0,6985	0,4033
	Tempo	4,0994	0,2509	5,8575	0,1188
	Tempo*Temp	13,4066	0,0038*	14,4552	0,0023*

LEGENDA: *N. rossii* sob os efeitos do aumento gradual de temperatura (05 °C/dia até alcançar as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C e 8 °C), tempo (T9, T13, T17, T21) e sua interação nas respostas das enzimas Na^+/K^+ ATPase e H^+ -ATPase nos tecidos branquial e renal de *N. rossii*. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$

4.9 Níveis de atividade de enzimas Na^+/K^+ ATPase e H^+ -ATPase branquial

Nas brânquias de *N. rossii* a Na^+/K^+ ATPase em 17 dias, nos grupos controle (0°C) e experimental (6 °C) apresentaram níveis de atividade menores quando comparadas com os demais tempos e temperaturas experimentais testadas (Figura 12a). A H^+ -ATPase também apresentou níveis de atividades menores no dia 9 nos grupos experimental (2 °C) e controle (0 °C) quando comparada aos grupos experimental e controle em 13 dias (Figura 12b)

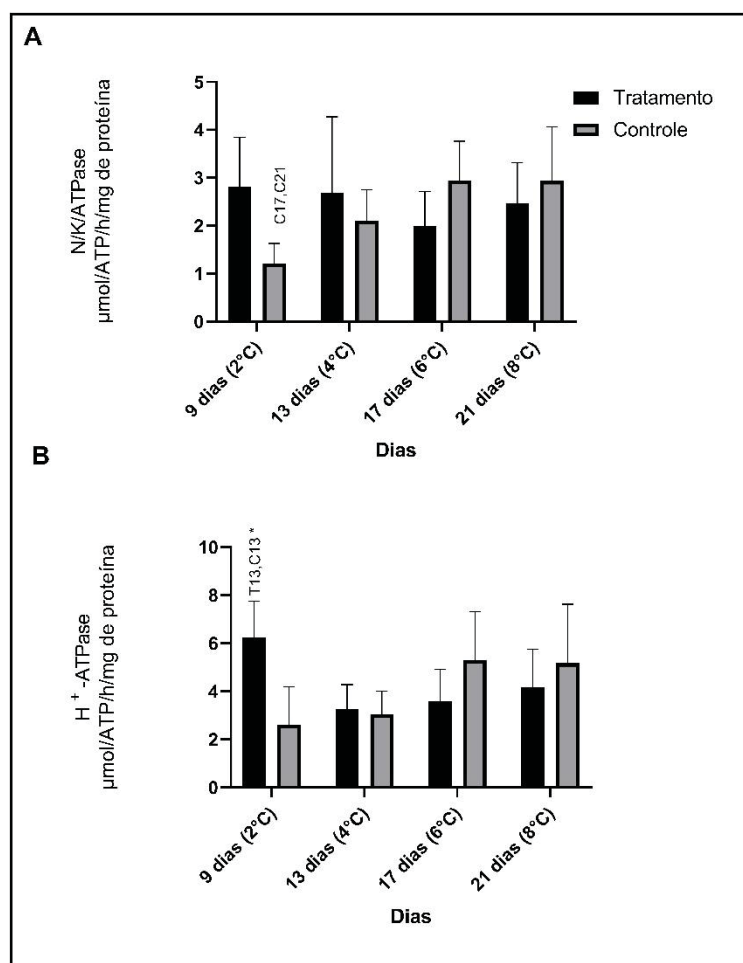
FIGURA 12- NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS Na^+/K^+ ATPase e H^+ -ATPase BRANQUIAL EM *Nothotenia rossii*



LEGENDA: *N. rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem alcançadas. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. **C=controle T=tratamento

4.10 Níveis de atividade de enzimas Na^+/K^+ ATPase e H^+ -ATPase renal

No rim de *N. rossii* a Na^+/K^+ ATPase apresentou níveis de atividade menores no grupo controle em 9 dias quando comparada com os grupos controle em 17 e 21 dias (Figura 13a). A H^+ -ATPase apresentou níveis maiores de atividade no grupo experimental (2 °C) em 9 dias quando comparada com seu respectivo grupo controle e com os grupos controle e experimental em 13 dias (4 e 0°C, respectivamente) (Figura 13b).

FIGURA 13- NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS Na^+/K^+ ATPase e H^+ -ATPase RENAL EM *Nothotenia rossii*

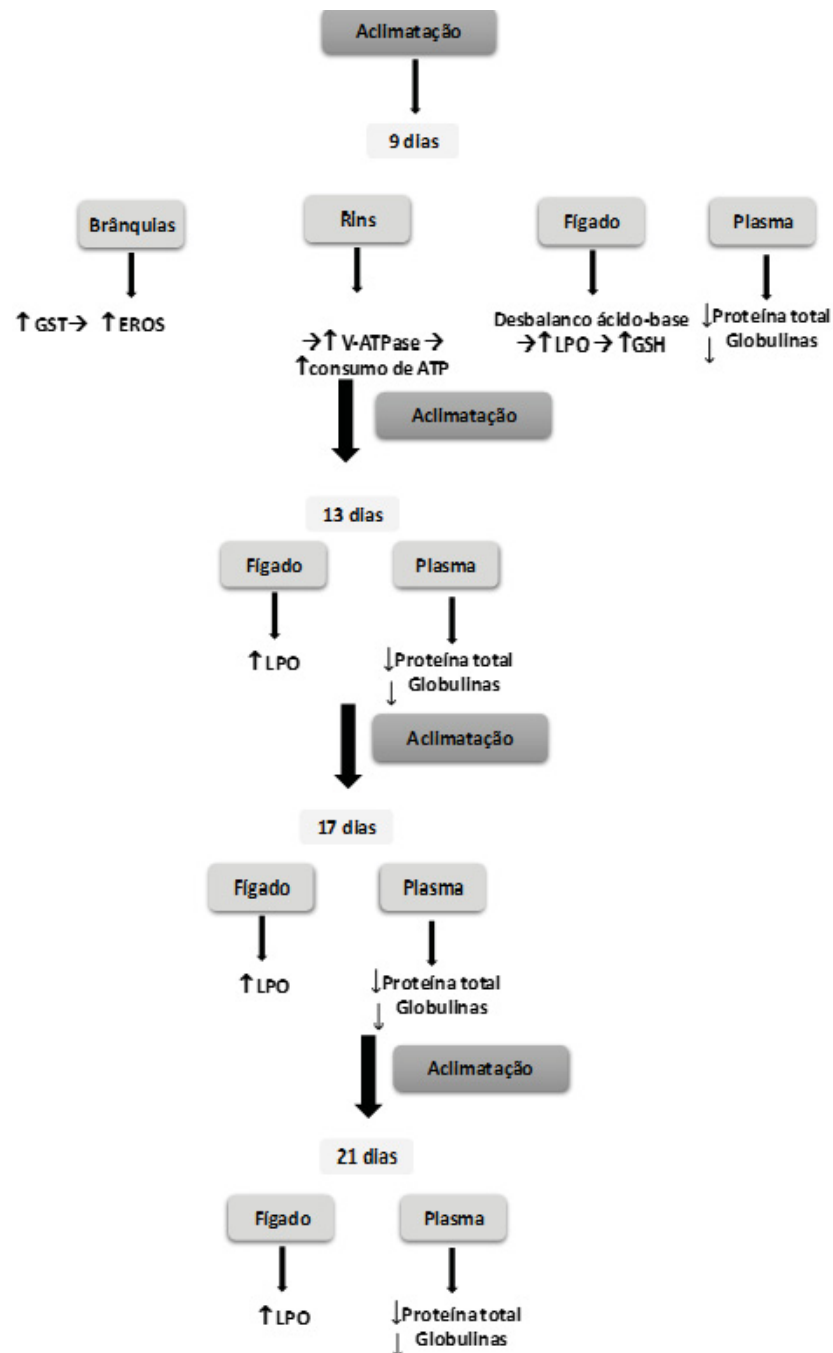
LEGENDA: *N. rossii* quando submetida à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia), até que as temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C fossem alcançadas. * indica variação estatística significativa, $p \leq 0,05$ entre grupo experimental e seu respectivo controle. Os números sobre as barras indicam diferença significativa entre os valores obtidos em diferentes tempos experimentais. **C=controle T=tratamento

5 DISCUSSÃO

Apesar de peixes antárticos possuírem a habilidade de viverem em ambientes extremamente frios e estáveis, com maior concentração de oxigênio tecidual e de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ANSALDO *et al.*, 2000; ABELE; PUNTARULO, 2004) porém, aumentos de temperatura podem torná-los mais vulneráveis às injúrias oxidativas pois podem gerar ainda mais EROs devido ao aumento no consumo de oxigênio e da taxa de rotina metabólica (ABELE *et al.*, 1998; HEISE *et al.*, 2003; KELLER *et al.*, 2004; MUELLER *et al.*, 2011; PÖRTNER, 2002; STROBEL *et al.*, 2013).

Frente ao aumento de produção de EROs é necessário que o organismo responda com mecanismos compensatórios para que os processos metabólicos decorrentes aconteçam de forma equilibrada a fim de preservar o bom estado fisiológico das células (FRANKLIN, 2010).

FIGURA 14 – ESQUEMA DE ALTERAÇÕES DE BIOMARCADORES DO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES EM *Nothotenia rossii*



LEGENDA: Biomarcadores do metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes, plasmáticos e da enzima H^+ -ATPase ao longo do tempo para *Nothotenia rossii* quando submetido à aumento gradual de temperatura ($0,5^\circ\text{C}/\text{dia}$). ATP- adenosina trifosfato; GST- glutathione-S-transferase; EROS- Espécies reativas de oxigênio; LPO- Lipoperoxidação e GSH- glutathione reduzida.

É esperada uma resposta branquial frente ao estresse térmico uma vez que as brânquias estão em contato íntimo com a água sendo expostas diretamente às alterações do meio aquático circundante como as mudanças de temperatura (PERRY; LAURENT, 1993; SABER, 2011). Em seu estado fisiológico normal as brânquias já possuem elevada taxa metabólica devido, principalmente ao processo de regulação iônica (JOHANSE; PETTERSON, 1981; MOMMSEN, 1984).

Nas brânquias aos 9 dias de experimento, quando a temperatura atingiu 2°C, houve aumento da atividade da GST (Figura 14). Essa enzima é responsável pela conjugação de xenobióticos à GSH, facilitando sua eliminação. Outras isoformas de GST com funções diversas são conhecidas, como o transporte intracelular de proteínas e a regulação da apoptose, processo que pode estar aumentado em situações de estresse (HALLIWELL; GUTTERIDGE., 2007, LABORDE, 2010).

A exposição a fatores de estresse ambiental pode regular vários genes, estimulando ou inibindo a expressão gênica de proteínas relacionadas a funções de proteção celular (RIZWAN-UL-HAQ *et al.* 2012).

Em estudos de estresse agudo, não se observou aumento da atividade da GST branquial (FORGATI *et al.*, 2017, KLEIN *et al.*, 2017) e ocorreu somente um aumento transiente de GSH (FORGATI *et al.*, 2017). Nesse presente estudo não houve alteração na concentração de GSH diante do aumento da atividade da GST, mas isso pode ter ocorrido pelo rápido consumo e reposição da GSH, já que este tripeptídeo é rapidamente oxidado em situações em que ocorra aumento na produção de radicais livres (SK; BHATTACHARYA, 2006; TAPIERO; TEW 2003).

As reações catalizadas por GST produzem a glutatona oxidada ou dissulfeto (GSSG) (HERMES-LIMA, 2004), e desta forma a célula precisa repor os estoques de GSH pelo uso de NADPH. A reposição de NADPH através das vias das pentoses desvia a glicose da produção de energia, o que poderia contribuir, além do estresse térmico, para a necessidade do organismo em desencadear respostas compensatórias, como observado no capítulo 1, nas brânquias de *N. rossii* submetidas ao mesmo modelo experimental.

Aos 9 dias de experimento, quando a temperatura atingiu 2 °C, houve elevação na concentração de tióis não protéicos no fígado de *N. rossii*, sendo o mais expressivo entre eles a glutathione (Figura 14). A GSH é considerada o principal antioxidante intracelular e pode atuar como cofator para as enzimas GSH-dependentes (SK; BHATTACHARYA, 2006; TAPIERO, 2003).

Resposta semelhante foi observada em estudo de estresse agudo em *N. rossii* quando mantida a 8°C por 6 dias onde os níveis de GSH aumentaram expressivamente ao longo do tempo (MACHADO *et al.*, 2014).

Uma maior disponibilidade de glutathione pode aumentar a disponibilidade de substrato, permitindo maior *turnover* das enzimas que necessitam de GSH, conferindo à célula uma maior capacidade em neutralizar EROs. Nesse estudo, no entanto, não houve alteração nos níveis de atividade das enzimas GSH-dependentes no fígado, possivelmente -

Durante todo o período de aclimação os níveis de MDA hepático mantiveram-se elevados, configurando uma resposta contínua de lipoperoxidação (Figura 14). Um elevado índice de LPO é esperado para peixes antárticos sob estresse oxidativo, tendo em vista o elevado nível de ácidos graxos mono e poliinsaturados nesses animais (SIDEELL, 1998).

Os produtos gerados pela LPO, são detoxificados através de sua conjugação com a GSH por meio da GST o que pode ser uma justificativa do aumento observado dos tióis em 9 dias (2 °C) como tentativa de manter o equilíbrio redox. No entanto, o permanente aumento nas concentrações de LPO indicam que o equilíbrio não foi alcançado.

Em *N. rossii* aumentos na LPO hepática não ocorreram em modelos de estresse agudo (MACHADO *et al.*, 2014; KLEIN *et al.*, 2017). Mas níveis aumentados de LPO no fígado também foram observados em outros peixes antárticos, como exemplos, em *P. borchgrevinki* (ALMROTH *et al.*, 2015), e *Pachycara brachycephalum* (HEISE *et al.*, 2007) em exposição a elevadas temperaturas a longo prazo. O que pode sugerir que para a LPO o tempo de exposição ao agente estressor possa ser mais relevante que sua magnitude.

As alterações pontuais do efeito do aumento gradual de temperatura observadas nesse trabalho podem ser justificadas pelos mecanismos de adaptação às ações deletérias do oxigênio dos nototenídeos. No entanto, a

presença contante da LPO demonstrou que os níveis de enzimas antioxidantes presentes em cada tecido não foram suficientes para combater os efeitos do estresse oxidativo gerado pelo aumento térmico.

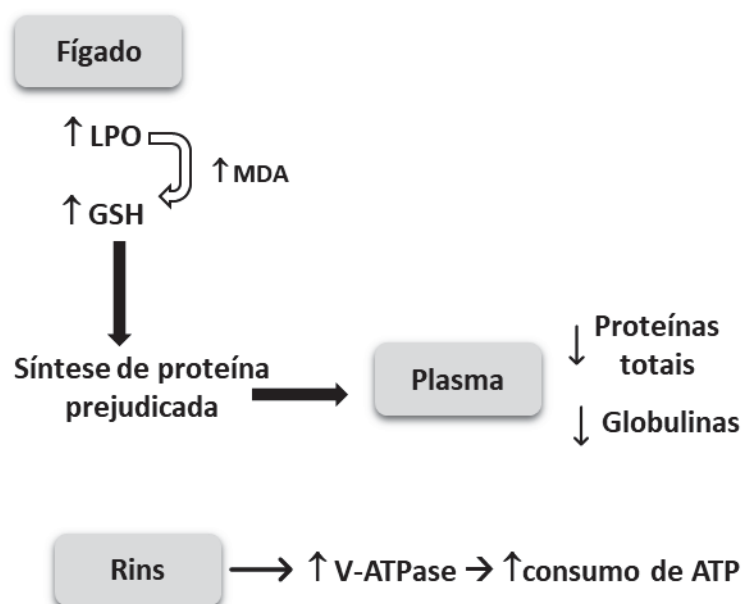
N. rossii dispõe ainda de outros mecanismos antioxidantes enzimáticos como as tioredoxinas e peroxirredoxinas e não enzimáticos como as vitaminas C e E a serem considerados no equilíbrio redox como um todo (GIESEG *et al.*, 2000; ABELE; PUNTARULO, 2004).

No plasma de *N. rossii* ocorreu diminuição da concentração de proteínas totais (albumina e globulinas) (Figura 14).. Resultado semelhante foi observado em modelo de estresse à longo prazo (90 dias) onde também se observou diminuição da concentração de globulinas plasmáticas (KANDALSKI *et al.* 2019).

Thorne *et al.* (2010) expuseram o nototenídeo *Harpagifer antarcticus* a estresse térmico (6°C por 48 h) e verificaram como resposta processos inflamatórios no tecido hepático e, quando o processo inflamatório é crônico, no caso da aclimação gradual, pode se dar a hipoglobulinemia. O estresse térmico analisado em fígado de *P. brachycephalum* causou diminuição do conteúdo protéico nesse tecido (BRODTE *et al.*, 2008).

A LPO hepática observada em todos os tempos experimentais desse estudo também pode ter prejudicado a síntese de proteínas, entre elas as globulinas, uma vez que este órgão é responsável por 85-90% do volume de proteínas circulantes (TREFTS *et al.*, 2017). A concentração da albumina, por ter meia vida longa, pode ter mascarado diminuições em sua concentração (ANDREEVA, 2010; PERES *et al.*, 2015; TREFTS *et al.*, 2017).

O aumento da H⁺-ATPase nos rins aos 9 dias à 2°C pode indicar que a acidificação plasmática já estava ocorrendo (Figura 15). As células intercalares renais são um dos tipos de células especializadas que apresentam a H⁺-ATPase na membrana plasmática (NISCH; FORGAC, 2002) cuja função é importante para o equilíbrio ácido-base sistêmico, através da secreção de ácido na urina (BROWN; BRETON, 2000; PERRY *et al.*, 2000; DUARTE *et al.*, 2013). A atividade da H⁺-ATPase pressupõe a desfosforilação de ATP que, por consequência, poderia agravar o desbalanço na demanda energética nesse órgão conforme visto no capítulo 1, levando à ativação da via gliconeogênica.

FIGURA 15 – ALTERAÇÃO DE BIOMARCADORES EM *Nothotenia rossii* E SUAS INTERRELAÇÕES

LEGENDA: Esquema de alterações de biomarcadores ao longo do tempo para *Nothotenia rossii* quando submetido à aumento gradual de temperatura (0,5°C/dia). MDA- Malondialdeído; ATP- adenosina trifosfato; GSH- Glutathione; LPO- Lipoperoxidação.

Em modelos de estresse agudo e choque térmico se observou efeito hiperglicemiante frente ao calor em *N. rossii* (KANDALSKI *et al.*, 2018) e em outras espécies antárticas (LOWE; DAVIDSON, 2015; KANDALSKI *et al.*, 2018) enquanto neste estudo não mostraram variação em seus níveis. A manutenção dos níveis de cortisol pode justificar, a ausência de hiperglicemia uma vez que estão relacionados (MOMMSEN *et al.*, 1999; BARTON, 2002; CHENG *et al.*, 2017).

Os parâmetros osmoiônicos cálcio, cloreto, fósforo e magnésio também não sofreram alteração em sua concentração frente ao aumento gradual de temperatura. É preciso considerar que o tempo da resposta inter-renal ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) para produção de cortisol tem uma latência de minutos até horas assim como a alteração nos níveis plasmáticos de íons (PANKHURST, 2011).

É possível que devido ao delineamento experimental de nosso estudo, onde a primeira coleta amostral se deu 9 dias após exposição ao agente

estressor, podemos ter perdido as variações plasmáticas de alguns marcadores. *N. rossii* quando submetida à choque térmico apresentou alterações apenas no íon Mg ate 12 horas de exposição a 8°C (KANDALSKI *et al.*, 2018).

Em *Ramdhia quelen*, um peixe subtropical, quando submetido a estresse térmico, o pico de cortisol se deu rapidamente, para indivíduos juvenis, entre 5 e 30 minutos, e em indivíduos adultos em 60 minutos. Após 240 minutos os níveis de cortisol já haviam retornado para o basal (KOAKOSKI *et al.*, 2012). Já Hudson *et al.* (2008) não observaram variação nos níveis de cortisol de *Trematomus bernachii* quando exposto a um aumento de temperatura em tempo maior, 24 e 48 horas e em 1,2 e 4 semanas.

Também não ocorreu aumento nos marcadores plasmáticos lactato, piruvato e a enzima LDH, resultado semelhante ao encontrado em *N. rossii* frente à choque térmico (STROBEL *et al.*, 2012; KANDALSKI *et al.*, 2018). A ausência de alterações nos níveis de lactato e LDH plasmáticos está de acordo com a ausência de aumento desses metabólicos intermediários nos tecidos, à exceção de um aumento pontual no fígado, conforme capítulo 1.

Apesar dos resultados sugerirem uma demanda aumentada de ATP, conforme observado no capítulo 1, não se observou diminuição na concentração de triglicerídeos plasmáticos, que atuam como rápida fonte de energia durante as condições de estresse (LOWE; DAVIDSON, 2005), podendo ser transportados via corrente sanguínea ligados à albumina (ADAMU; KORI--SIKPERE, 2011). É possível que um aumento na concentração de triglicerídeos tenha acontecido antes da primeira coleta amostral. A concentração de colesterol também não sofreu alteração indicando que o estresse térmico gradual não comprometeu a estrutura celular, nem a produção de hormônios esteroides. Assim como observado para *N. rossii* em situação de choque térmico (KANDALSKI *et al.*, 2018).

6 CONCLUSÃO

O aumento gradual da temperatura desencadeou respostas do metabolismo oxidativo e plasmáticas distintas das relatadas em estudos de choque térmico. Entre elas, o aumento da atividade da GST branquial indicando aumento na produção de EROs e o aumento persistente da LPO hepática sugerindo que para a LPO o tempo de exposição ao agente estressor parece ser mais relevante que sua magnitude.

Os dados obtidos de LPO hepática podem estar relacionados ao aumento da GSH e o comprometimento hepático parece ter influenciado a composição proteica plasmática, já que a síntese de globulinas pode ter sido alterada frente ao aumento gradual da temperatura.

Outra possibilidade é que o pH plasmático de *N. rossii* foi alterado, corroborado pelo aumento da atividade da H⁺-ATPase renal e pela hiperlactatemia hepática,

Em situação de aclimação térmica, parâmetros iônicos, cortisol e glicemia não são indicados como bons marcadores possivelmente pela rapidez que são liberados no plasma.

7 REFERÊNCIAS

ABELE, D.; BURLANGO, B.; VIARENGO, A.; PÖRTNER, H.O. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. **Comparative Biochemical Physiology part B**. v. 120, p.425–435, 1998

ABELE, D., PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 138, p. 405–415, 2004.

ADAMU, K. M.; KORI-SIAKPERE, O. Effects of sublethal concentrations of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf dust on some biochemical parameters of Hybrid catfish (*Clarias gariepinus* and *Heterobranchus bidorsalis*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 1, p. 183–196, 2011.

ALMROTH, B. C.; ASKER, N.; WASSMUR, B.; ROSENGRE, M.; JUTFELE, F.; GRÄNS, A.; SUNDELL, K.; AXELSSON, M.; STURVE, J. Warmer water temperature results in oxidative damage in an Antarctic fish, the bald notothen. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 468, p. 130–137, 2015.

ANDERSON, M. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**. v.26, p.32 – 46, 2011.

ANDREEVA, A. M. The role of structural organization of blood plasma proteins in the stabilization of water metabolism in bony fish (Teleostei). **Journal of Ichthyology**, v. 50, n. 7, p. 552–558, 2010.

ANSALDO M, LUQUET CM, EVELSON PA, POLO JAM, LLESUY S.: Antioxidant levels from different Antarctic fish caught around South Georgia Island and Shag Rocks. **Polar Biology**, v. 23, p.160 – 165, 2000.

ATKINSON, A.; SIEGEL, V.; PAKHOMOV, E.; ROTHERY, P. Long-term decline in krill stock and increase in salps within the Southern Ocean. **Nature**. v.432, p.100-103.2004.

BARTON, B.A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v.42 n.3, p.517-525, 2002.

BEGG, K.; PANKHURST, N.W.; Endocrine and metabolic responses to stress in laboratory population of the tropical damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. **Journal of fish Biology**. v. 64 (1), p. 133-145, 2004.

BEERS, J. M.; JAYASUNDARA, N. Antarctic notothenioid fish: what are the future consequences of 'losses' and 'gains' acquired during long-term evolution at cold and stable temperatures? **The Journal of Experimental Biology**. v. 218, p. 1834-1845, 2015.

BILYK, K. T.; DE VRIES, A. L. Heat tolerance and its plasticity in Antarctic fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 158, p. 382-90, 2011.

BEUTLER, E. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. New York: Grune & Stratton, p.160, 1975.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of rotein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRETON, S. and BROWN, D. New insights into the regulation of V-ATPase-dependent proton secretion. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, vol. 292 (1), p. 1-10. 2000.

BRODTE, E., GRAEVE, M., JACOB, U., KNUST, R; PÖRTNER, H.-O. Temperature-dependent lipid levels and components in polar and temperate eelpout (Zoarcidae). **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 34, n. 3, p. 261-74, 2008.

BUCKLEY, B. A.; PLACE, S. P.; HOFMANN, G. E. Regulation of heat shock genes in isolated hepatocytes from an Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*. **Journal of Fish Biology**, v.207, p.3649–3656, 2004.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 250, p. 5475–5480, 1975.

CHENG, C. H.; YE, C. X.; GUO, Z. X.; WANG, A. L. Immune and physiological responses of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under cold stress. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 64, p. 137–145, 2017.

CONVEY, P.; BINDSCHADLER, R.; DI PRISCO, G.; FAHRBACH, E.; GUTT, J.; HODGSON, D.A.; MAYEWSKI, P.A.; SUMMERHAYES, C. P.; TURNER, J. Antarctic climate change and the environment. **Antarctic Science**. v. 21, p. 541– 563, 2009.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. C.; KINSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, p. 235-241, 1981.

DE VRIES, A.L.; CHENG, C.H.C. Antifreeze proteins and organismal freezing avoidance in polar fishes. **Fish Physiology**. v.22, p.155-201, 2005.

DONATTI, L.; FANTA, E. Influence of photoperiod on visual prey detection in the Antarctic fish *Nothotenia neglecta* Nybelin. **Antarctic Science** v. 14, p. 146–150, 2002.

DUARTE, R.M., FERREIRA, M.S.; WOOD, C.M.; VAL A.L. Effect of low pH on Na⁺ regulation in two cichlid fish species of the Amazon. **Comparative**

Biochemistry and Physiology part A: Molecular & Integrative Physiology. v. 166, n.3, p. 441-448, 2013.

ENZOR, L. A.; PLACE, S. P. Is warmer better? Decreased oxidative damage in notothenioid fish after long-term acclimation to multiple stressors. **The Journal of Experimental Biology.** v. 217, p. 3301-3310, 2014.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J., HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415-430, 2007.

FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; MACHADO, C.; SOUZA, M. R. D. P.; DONATTI, L. Effects of heat stress on the renal and branchial carbohydrate metabolism and antioxidant system of Antarctic fish. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 0, n. 0, p. 1–18, 2017.

GIBBS, A.; SOMERO, G. N. Pressure adaptations of Na⁺ /K⁺ -ATPase in gills of marine teleosts. **The Journal of Experimental Biology.** v. 143, p. 475-492, 1989.

GIESEG, S. P.; CUDDIHY, S.; HILL, J. V.; DAVISON, W. A comparison of plasma vitamin C and E levels in two Antarctic and two temperate water fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B.** v. 125, p. 371–378, 2000.

GONZALEZ-CABRERA, P. J.; DOWD, F.; PEDIBHOTLA, V. K.; ROSARIO, R.; STANLEY-SAMUELSON, D.; PETZEL, D. Enhanced hypo-osmoregulation induced by warm-acclimation in antarctic fish is mediated by increased gill and kidney Na⁺ /K⁺ -ATPase activities. **The Journal of experimental biology**, v. 198, n. Pt 11, p. 2279–2291, 1995.

GUDERLEY, H.; ST-PIERRE, J. Going with the flow in the fast lane: contrasting mitochondrial responses to thermal change. **The Journal of Experimental Biology.** v. 205, p. 2237-2249, 2002.

GUYNN, S.; DOWD, F.; PETZEL, D. Characterization of gill Na/K-ATPase activity and ouabain binding in Antarctic and New Zealand nototheniid fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 131, n. 2, p. 363–374, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford, London, 2007.

HARROWER, J.R.; BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 32, p. 224-228, 1972.

HEISE, K.; PUNTARULO, S.; PÖRTNER, H. O.; ABELE, D. (2003). Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 134, p. 79-90, 2003.

HEISE, K., ESTEVEZ, M. S., PUNTARULO, S., GALLEANO, M., NIKINMAA, M., PORTNER, H. O.; ABELE, D. Effects of seasonal and latitudinal cold on oxidative stress parameters and activation of hypoxia inducible factor (HIF-1) in zoarcid fish. **Journal of Comparative Physiology, Part B**. v. 177, p. 765-777, 2007.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. **Functional metabolism: Regulation and adaptation**, v. 1, p. 319-66, 2004.

HOFMANN, G.E.; BUCKLEY, B.A.; AIRAKSINEN S.; KEEN J.E.; Somero G.N. Heatshock protein expression is absent in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* (family Nototheniidae). **Journal of Experimental Biology** 203:2331–2339. 2000.

HUDSON, H. A.; BRAUER, P. R.; SCOFIELD, M. A.; PETZEL, D. H. Effects of warm acclimation on serum osmolality, cortisol and hematocrit levels in the Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v. 31, n. 8, p. 991–997, 2008.

HUEY, R.B.; STEVENSON, R.D. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: A Discussion of Approaches. **American Zoologist**. v.19, p. 357-366, 1979

JAYASUNDARA, N.; HEALY, T. M.; SOMERO, G. N. Effects of temperature acclimation on cardiorespiratory performance of the Antarctic notothenioid *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v. 36, n. 7, p. 1047–1057, 2013.

JOHANSEN, K.; PETTERSSON, K. Gill O₂ consumption in a teleost fish, *Gadus morhua*. **Respiration Physiology**. v. 44, p. 277-284, 1981.

JOHNSON, T.P; BENNETT, A.F. The thermal acclimation of burst escape performance in fish: an integrated study of molecular and cellular physiology and organismal performance. **Journal of Experimental Biology**.v.198, p. 2165-2175,1995.

JIN, Y.; DE VRIES, A.L. Antifreeze glycoprotein levels in Antarctic notothenioid fishes inhabiting different thermal environments and the effect of warm acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.144, n.3, p.290-300, 2006.

KANDALSKI, P.K.; SOUZA, M. R. D. P.; HERRERIAS, T.; MACHADO, C., ZALESKI, T., FORGATI, M.; GUILLEN, A.C.; VIANA, D.; MOURA, M.; DONATTI, L. Effects of short-term thermal stress on the plasma biochemical profiles of two Antarctic nototheniid species. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 2018

KELLER, M.; SOMMER, A. M.; PÖRTNER, H. O.; ABELE, D. Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 2529-2538, 2004.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for Several Activities of the Glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**. v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KLEIN, R. D.; BORGES, V. D.; ROSA, C. E.; COLARES, E. P.; ROBALDO, R. B.; MARTINEZ, P. E.; BIANCHINI, A. Effects of increasing temperature on antioxidant defense system and oxidative stress parameters in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Journal of Thermal Biology**, v. 68, n. February, p. 110–118, 2017a.

KOAKOSKI, G.; OLIVEIRA T.A.; ROSA, J.G.S.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L.C.; BARCELLOS L.J.G. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. *Physiology and Behavior*. v. 106 (2), p.129-132, 2012.

KREISS, C.M.; MICHAEL, K. LUCASSEN, M.; JUTFELT, F.; MOTYKA, R.; DUPONT, S.; PÖRTNER, H.O. Ocean warming and acidification modulated energy budget and gill ion regulatory mechanisms in Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Journal of Comparative Physiology part B**. v.185, n. 7, p. 767-781, 2015.

KÜLTZ, D.; SOMERO, G. N. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 1883-1894, 1995.

LABORDE, E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. **Cell Death Differ**. v.17(9), p. 1373-1380, 2010.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**. v. 233, p. 346–357, 1994.

LOWE, C. J.; DAVISON, W. Plasma osmolarity, glucose concentration and erythrocyte responses of two Antarctic nototheniid fishes to acute and chronic thermal change. **Journal of Fish Biology**. v. 67, p.752-766, 2005.

LU, G. D. The metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochemical Journal**, v. 33, p. 249-254, 1939.

MACHADO, C.; ZALESKI, T.; RODRIGUES, E.; CARVALHO, C. D. S.; CADENA, S. M. S. C.; GOZZI, G. J.; KREBSBACH, P.; RIOS, F. S'A.; DONATTI, L. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*.

Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v.172–173, p.21–28, 2014.

MOMMSEN, T. P. Metabolism of the Fish Gill. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (eds.) *Fish Physiology*. Vol. XB. Orlando: Academic Press, 1984. p. 203-237.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, n. 3, p. 211–268, 1999.

MUELLER, I.; HOFFMAN, M.; DULLEN, K.; O'BRIEN, K.; Moderate elevations in temperature do not increase oxidative stress in oxidative muscles of Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v.37, p.311–320, 2014.

NISH, T.; FORGAC, M. The vacuolar (H⁺)-ATPases nature's most versatile proton pumps. **Nature reviews in Molecular and Cellular biology**, v. 3, n. 2, p.94-103, 2002.

PANKHURST, N. W. The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 265–275, 2011

PECK, L. S. Ecophysiology of Antarctic marine ectotherms: limits to life. **Polar Biology**, v. 25, p. 31-40, 2002.

PERES, H.; COSTAS, B.; PEREZ-JIMENEZ, A.; GUERREIRO, I.; OLIVATELES, A. Reference values for selected hematological and serum biochemical parameters of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles under intensive aquaculture conditions. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 31, n. 1, p. 65–71, 2015.

PERRY, S. F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIN, J. C.; JENSEN, F. B. (eds.). *Fish Ecophysiology*. London: Chapman; Hall, 1993. p. 231-264.

PERRY, S. F.; BEYERS, M. L.; JOHNSON, D. A. Cloning and molecular characterisation of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) vacuolar H⁺-ATPase B subunit. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 459-470, 2000.

PETZEL, D. Drinking in Antarctic fishes. **Polar Biology**, v. 28, n. 10, p. 763–768, 2005.

PLACE, S.P.; HOFMANN, G.E. Constitutive expression of a stress-inducible heat shock protein gene, hsp70, in phylogenetically distant Antarctic fish. **Polar Biology**, v. 28, p.261-267, 2005.

PODRABSKY, J. E.; SOMERO, G. N. Inducible heat tolerance in Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v. 30, p. 39–43, 2006.

PÖRTNER H.O. Physiological basis of temperature-dependent biogeography: trade-offs in muscle design and performance in polar ectotherms. **The Journal of Experimental Biology**. v. 205, p.2217–2230, 2002.

PÖRTNER, H.O.; KNUST, R. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. **Science**, v.315, p.95-97, 2007.

PÖRTNER, H. O.; PECK, M. A. Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. **Journal of Fish Biology**. v. 77, p. 1745– 1779, 2010.

R: DEVELOPMENT CORE TEAM (2013) A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-90051-07-0. URL R-Project.org.

RODRIGUES JR, E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M.; VANI, G. S.; SUDA, C. N. K.; CARVALHO, C. S.; DONATTI, L.; LAVRADO, H. P.; RODRIGUES, E. Interaction of warm acclimation, low salinity, and trophic fluoride on plasmatic constituents of the Antarctic fish *Nothotenia rossii* Richardson, 1844. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1591-1601, 2013.

RODRIGUES Jr E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M. SUDA, C. N. K.; VANI, G. S.; DONATTI, L. RODRIGUES, E.; LAVRADO, H. P. Metabolic responses of the Antarctic fishes *Nothotenia rossii* and *Nothotenia coriiceps* to sewage pollution. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 41, n. 5, p. 1205-1220, 2015.

SABER, T. H. Histological adaptation to thermal changes in gills of common carp fishes *Cyprinus carpio* L. Rafidain. **Journal of Science**. v. 22, p. 1-16, 2011.

SEDILAK, J.; LINDSAY, R.H.C. Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. **Analytical Biochemistry**, 25: 192–205, 1968.

SIDELL BD, DRIEDZIC R, STOWE B, JOHNSTON A. Biochemical correlations of power development and metabolic fuel preferenda in fish hearts. **Physiology and Zoology**, v. 60, p.221– 232, 1987.

SIDELL, B. D. Intracellular oxygen diffusion: the roles of myoglobin and lipid at cold body temperature. **The Journal of Experimental Biology**. v. 201, p. 1118–1127, 1998.

SK, U.H.; BHATTACHARYA, S. Prevention of cadmium induced lipid peroxidation, depletion of some antioxidative enzymes and glutathione by series of novel **organoselenocyanates** **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, p.298–308, 2006.

SOMERO, G. N.; DE VRIES, A. L. Temperature tolerance of some antarctic fishes. **Science**, v. 156, p. 257, 1967.

SOUZA, M. R. D. P.; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; MACHADO, C.; SILVA, D. T.; PIECHNIK, C. A.; MOURA, M. O.; DONATTI, L. Heat stress in the heart and muscle of the Antarctic fishes *Nothotenia rossii* and *Nothotenia coriiceps*: Carbohydrate metabolism and antioxidant defence. **Biochimie**, v. 146, p. 43-55, 2018.

STASTNA, V. Spatio-temporal changes in surface air temperature in the region of the northern Antarctic Peninsula and south Shetland islands during 1950–2003. **Polar Science**.v.4, p.18-33, 2010.

STROBEL, A.; BENNECKE, S.; LEO, E.; MINTENBECK, K.; PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C. Metabolic shifts in the Antarctic fish *Nothotenia rossii* in response to rising temperature and PCO₂. **Frontiers in Zoology**, v. 9, n. 1, p. 28, 2012.

TAPIERO H, TEW KD. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine Pharmacotherapy**. V. 57(3-4), p:145-155, 2003.

THORNE, M. A. S.; BURNS, G.; FRASER, K. P. P.; HILLYARD, G.; CLARK, M. S. Transcription profiling of acute temperature stress in the Antarctic plunderfish *Harpagifer antarcticus*. **Marine Genomics**, v. 3, n. 1, p. 35–44, 2010.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.85, n.3, p.603-611, 2005.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASEERMAN, D.H.; The liver. **Current Biology**. v.27(21), p.1147-1151, 2017.

TURNER, J.; COLWELL, S.R.; MARSHALL, G.J.; LACHLAN-COPE, T.A.; CARLETON, A.M.; JONES, P.D.; LAGUN, V.; REID, P.A.; IAGOVKINA, A, S. Antarctic climate change during the last 50 years. **International Journal of Climatology**, v.25, p.279-294, 2005.

TURNER, J.; BARRAND, N. E.; BRACEGIRDLE, T. J.; CONVEY, P.; HODGSON, D. A.; JARVIS, M.; JENKINS, A.; MARSHALL, G.; MEREDITH, M. P.; ROSCOE, H.; SHANKLIN, J. Antarctic climate change and the environment: an update. **Polar Record (Gr Brit)** v. 50, p. 237–259, 2014.

WILSON, R. S.; KUCHEL, L. J.; FRANKLIN, C. E.; DAVISON, W. Turning up the heat on subzero fish: Thermal dependence of sustained swimming in an Antarctic notothenioid. **Journal of Thermal Biology**, v. 27, n. 5, p. 381–386, 2002.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. v. 77, p. 325-333, 1981.

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *Journal of Fish Biology*. v. 60, p. 340–347, 2002.

YAMASHITA, M.; YABU, T.; OJIMA, N. Stress protein Hsp70 in fish. ***AquaBioScience Monographs***. v. 3, n. 4, p. 111-141, 2010.

CAPÍTULO III

Análise integrada de biomarcadores do metabolismo de carboidratos e o sistema de defesa antioxidante, em peixes antárticos *N. rossii* frente ao aumento de temperatura

RESUMO

Dentre as mudanças ambientais previstas, aumento de temperatura pode ser o fator que mais influencia os processos fisiológicos e ecológicos. Frente ao estresse térmico, a capacidade de aclimação de organismos antárticos pode ser limitada e variar entre as espécies. As respostas ao estresse dependem do tempo de exposição e magnitude e suas interações frente ao agente estressor. Análises de biomarcadores isoladamente podem ser limitadas pois não permitem uma análise integrada das respostas ao estresse. Por isso, este estudo verificou os efeitos dos fatores temperatura (0,5 °C /dia), tempo (9,13, 17 e 21 dias), tipo de órgão (brânquias, rim, fígado e encéfalo) e suas múltiplas combinações no metabolismo energético e oxidativo de *Nothotenia rossii*, submetido ao aumento gradual de temperatura. O fator tempo foi capaz de influenciar ambos os metabolismos analisados e deve ser considerado em situações experimentais. O metabolismo energético apresentou-se vulnerável à temperatura em interação com o tempo e dentre os órgãos o rim sofreu influencia isolada da temperatura possivelmente pelo seu importante papel de exportador de glicose. Nos órgãos analisados metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes não apresentou-se vulnerável ao fator temperatura isoladamente à exceção do fígado provavelmente por sua vulnerabilidade à lipoperoxidação.

Palavras-chave: Peixes antárticos. Metabolismo. Bioindicadores bioquímicos.
Temperatura. Baía do Almirantado.

1 INTRODUÇÃO

Diversas mudanças ambientais são previstas em decorrência da ação antropogênica no aquecimento global e dentre elas, aumentos significativos nas temperaturas das águas oceânicas antárticas. O aumento de temperatura configura uma importante alteração ambiental, pois influencia processos fisiológica e ecológicos através de escalas biológicas que variam de genes até ecossistemas (PECK, 2011).

A aclimação permite um ajuste de determinada espécie a um novo ambiente ou a um ambiente em mudança. Isso envolve a plasticidade fenotípica que provê resiliência à estressores, como a temperatura. Algumas espécies marinhas parecem estar no limite de sua capacidade de suporte fisiológico (SUNDAY *et al.*, 2014) enquanto para outras espécies, sobretudo as polares, a aclimação à variação de temperatura podem ser limitadas (PECK *et al.*, 2009; PECK *et al.*, 2014).

A capacidade de aclimação diante do estresse térmico tem grande variação entre os organismos antárticos, com limites de tolerância térmica estabelecidos por várias restrições fisiológicas (SOMERO, 2010). Alguns organismos têm capacidade de alterar sua fisiologia em resposta à fatores ambientais reduzindo o estresse diante de elevadas temperaturas (SEEBACHER *et al.*, 2015; FORGATI *et al.*, 2017.; KANDALSKI *et al.*, 2018; KANDALSKI *et al.*, 2019).

A resposta celular ao estresse (CRS) pode acontecer em diferentes níveis, dado à sua intensidade (leve, moderado e grave) (LOGAN; SOMERO, 2010). Nos níveis leves pode haver, por exemplo, alteração nas estruturas e na agregação citosólica de proteínas. Em níveis moderados o estresse térmico é associado com a denaturação de proteínas e proteólise. E, por fim, em níveis graves a célula inteira sofre dano, como nos danos ao DNA e lipoperoxidação levando a apoptose (LOGAN; SOMERO, 2011; MADEIRA *et al.*, 2016).

No entanto, a magnitude desta resposta celular depende de fatores estressores como o tempo, magnitude, exposição e suas interações, formando uma matriz complexa desses agentes que, juntos ou isoladamente, podem

desencadear diferentes respostas fisiológicas frente ao estresse (BARTON *et al.*, 2002, PECK, 2011).

O estudo de biomarcadores metabólicos, enzimáticos e não enzimáticos pode ser limitado uma vez que não permite integrar os dados obtidos e categorizar o nível de resposta estressora. Assim, é importante aplicar um método que possa resumir e integrar as respostas dos biomarcadores, para que as informações sejam interpretadas em um conjunto de dados multivariados.

Considerando análises integradas o presente estudo tem como principal objetivo avaliar a resposta ao estresse em *N. rossii* exposto à variação gradual de temperatura (0,5°C/dia; 2,4,6 e 8°C), ao longo de tempo (9,13, 17 e 21 dias) e em diferentes tecidos (brânquial, renal, hepático e encefálico) através de uma análise multivariada agrupando biomarcadores em dois diferentes metabolismos (energético de carboidratos e oxidativo)

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a resposta ao estresse em *N. rossii* exposto à variação gradual de temperatura (0,5°C/dia), ao longo de tempo (9, 13, 17 e 21 dias) e em diferentes tecidos (branquial, renal, hepático e encefálico) do metabolismo energético de carboidratos e do sistema de defesa antioxidante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Declaração de ética

O trabalho foi executado de acordo com a ética e regras das leis brasileiras e do Tratado Antártico. O Ministério do Meio Ambiente concedeu a licença ambiental e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (CEUA - UFPR) sob o nº 496/2010 e 840/2015.

3.2 Coletas e manutenção dos animais

Idem capítulos I e II.

3.3 Aumento gradual de temperatura

Idem capítulos I e II.

3.4 Métodos analíticos

Idem capítulos I e II.

3.5 Análises estatística

Foram realizadas análises de PERMANOVA para determinar diferenças nas concentrações e níveis de atividade de biomarcadores em função do tipo de tratamento (experimental X controle) e tempo (9(2°C),13(4°C),17(6°C) e 21 dias(8°C). As análises foram realizadas separadamente para os conjuntos de biomarcadores de diferentes órgãos (brânquias, rins, fígado e encéfalo) e tipo de metabolismo (oxidativo e de defesas antioxidantes ou energético), totalizando 8 análises (Tabela 1). Também foram realizadas análises levando-se em conta o tipo de órgão estudado (brânquias, rins, fígado e encéfalo), considerando cada metabolismo (energético e do sistema de defesa antioxidante), ao tipo de tratamento (experimental X controle) e tempo 9(2°C),13(4°C),17(6°C) e 21 dias (8°C), totalizando 2 análises, nesse caso, apenas os parâmetros em comum foram analisados (Tabela 2).

TABELA 1 – AGRUPAMENTO DE BIOMARCADORES PARA ANÁLISE MULTIVARIADA PARA CADA ORGÃO E METABOLISMO ANALISADO DE *Nothotenia rossii*

	BRÂNQUIAS	RIM	FÍGADO	ENCÉFALO
METABOLISMO ENERGÉTICO	CS	CS	CS	CS
	HK	GP	GP	HK
	LDH	HK	HK	LDH
	MDH	LDH	LDH	MDH
	PFK	MDH	MDH	PFK
	GP	PFK	PFK	G6pase
	LACTATO	G6pase	G6pase	GP
	PIRUVATO	LACTATO	LACTATO	
	GLICOGÊNIO	PIRUVATO GLICOGÊNIO	PIRUVATO GLICOGÊNIO	
METABOLISMO OXIDATIVO	CATALASE	CATALASE	CATALASE	CATALASE
	G6PDH	G6PDH	G6PDH	G6PDH
	GPx	GPx	GPx	GPx
	GR	GR	GR	GR
	GST	GST	GST	GST
	LPO	LPO	LPO	LPO
	GSH	GSH	GSH	GSH
	SOD	SOD	SOD	SOD
	PCO	PCO	PCO	

LEGENDA: parâmetros agrupados em metabolismo e oxidativo para compor a matriz das análises multivariadas. CS - citrato sintase; HK- hexoquinase; LDH- lactato desidrogenase; MDH- malato desidrogenase; PFK- fosfofrutoquinase; GP- glicogênio fosforilase; G6Pase – glicose-6-fosfatase; G6PDH – glicose-6-fosfato-desidrogenase; GPx – glutathione peroxidase; GR- glutathione reductase; GST- glutathione-S-transferase; LPO- lipoperoxidação; GSH- glutathione; SOD- superóxido dismutase; PCO- carbonilação protéica.

4 RESULTADOS

Os animais sobreviveram ao longo dos tempos de experimentos (9, 13, 17 ou 21 dias) e nas temperaturas testadas (0, 2, 4, 6 e 8°C). As análises de variância mostraram que entre os biomarcadores testados, alguns apresentaram diferenças significativas quando influenciados pelos fatores temperatura, tempo e órgão, bem como, pela interação entre esses fatores.

4.1 Análise de variância do metabolismo de carboidratos

Nas brânquias de *N. rossii* os biomarcadores agrupados como metabolismo energético foram alterados pelo tempo ($F=4.25$, $p=0,001$) e pela interação do tempo e temperatura ($F=1.19$, $p=0,016$). O fator temperatura isoladamente não influenciou os biomarcadores analisados (Tabela 2).

TABELA 2- PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO BRANQUIAL DE *Nothotenia rossii*

	GL	SQ	MS	F	R ²	p
Temperatura	1	0.06434	0.064343	1.8561	0.03033	0.132
Tempo	3	0.44240	0.147468	4.2541	0.20857	0.001*
Temp X Tempo	3	0.22780	0.075933	1.1905	0.10739	0.016*
Resíduos	40	1.38660	0.034665		0.65370	
Total	47	2.12115			1.000	

LEGENDA: Efeitos da temperatura (05 °C/dia até alcançar as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C e 8 °C), tempo (T9, T13, T17, T21) e sua interação nas respostas de biomarcadores em *N. rossii*. GL= grau de liberdade; SQ= soma dos quadrados; MS= média da soma dos quadrados; Pseudo-F= valor F por permutação, * indica variação estatística significativa $p \leq 0,05$, valor p baseado em 999 permutações (o menor valor p possível é 0.001)

Nos rins de *N. rossii* os biomarcadores agrupados como metabolismo energético foram alterados pelo tempo ($F=8.61$, $p=0,001$), pela interação do tempo e temperatura ($F=2.48$, $p=0,026$) e pelo fator temperatura isoladamente ($F=2.64$, $p=0,047$) (Tabela 3).

TABELA 3- PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO RENAL DE *Nothotenia rossii*

	GL	SQ	MS	F	R ²	p
Temperatura	1	0.14107	0.14107	2.6498	0.05424	0.047*
Tempo	2	0.91768	0.45884	8.6187	0.35287	0.001*
Temp X Tempo	2	0.26415	0.13207	2.4808	0.10157	0.026*
Resíduos	24	1.27771	0.05324		0.49131	
Total	29	2.60061			1.000	

LEGENDA: Efeitos da temperatura (05 °C/dia até alcançar as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C e 8 °C), tempo (T9, T13, T17, T21) e sua interação nas respostas de biomarcadores em *N. rossii*. GL= grau de liberdade; SQ= soma dos quadrados; MS= média da soma dos quadrados; Pseudo-F= valor F por permutação, * indica variação estatística significativa $p \leq 0,05$, valor p baseado em 999 permutações (o menor valor p possível é 0.001)

No fígado de *N. rossii* os biomarcadores agrupados como metabolismo energético foram alterados pelo tempo ($F=5.37$, $p=0,001$) e pela interação do tempo e temperatura ($F=4.37$, $p=0,001$). O fator temperatura isoladamente não influenciou os biomarcadores analisados (Tabela 4).

TABELA 4 - PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO RENAL DE *Nothotenia rossii*

	GL	SQ	MS	F	R ²	p
Temperatura	1	0.05737	0.057370	1.2449	0.01992	0.293
Tempo	3	0.74305	0.247684	5.3748	0.25804	0.001*
Temp X Tempo	3	0.60449	0.201497	4.3725	0.20993	0.001*
Resíduos	32	1.47464	0.046082		0.51211	
Total	39	2.87955			1.000	

LEGENDA: Efeitos da temperatura (05 °C/dia até alcançar as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C e 8 °C), tempo (T9, T13, T17, T21) e sua interação nas respostas de biomarcadores em *N. rossii*. GL= grau de liberdade; SQ= soma dos quadrados; MS= média da soma dos quadrados; Pseudo-F= valor F por permutação, * indica variação estatística significativa $p \leq 0,05$, valor p baseado em 999 permutações (o menor valor p possível é 0.001)

No encéfalo de *N. rossii* os biomarcadores agrupados como metabolismo energético foram alterados pelo tempo ($F=20.34$, $p=0,001$) e pela

interação do tempo e temperatura ($F=5.05$, $p=0,002$). O fator temperatura isoladamente não influenciou os biomarcadores analisados (Tabela 5).

TABELA 5- PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO TECIDO ENCEFÁLICO DE *Nothotenia rossii*

	GL	SQ	MS	F	R ²	p
Temperatura	1	0.0725	0.07253	1.3965	0.01208	0.200
Tempo	3	3.1708	1.05693	20.3491	0.52799	0.001*
Temp X Tempo	3	0.7883	0.26277	5.0591	0.13127	0.002*
Resíduos	38	1.9737	0.05194		0.32866	
Total	45	6.0054			1.000	

LEGENDA: Efeitos da temperatura (05 °C/dia até alcançar as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C e 8 °C), tempo (T9, T13, T17, T21) e sua interação nas respostas de biomarcadores em *N. rossii*. GL= grau de liberdade; SQ= soma dos quadrados; MS= média da soma dos quadrados; Pseudo-F= valor F por permutação, * indica variação estatística significativa $p \leq 0,05$, valor p baseado em 999 permutações (o menor valor p possível é 0.001)

O fator tempo influenciou ($F=18.54$, $p=0,001$) (Tabela 6) o metabolismo energético de *N. rossii* quando considerados os tecidos branquial, renal, hepático e encefálico em conjunto. O fator órgão ($F=82.48$, $p=0,001$) também influenciou as respostas do metabolismo de *N. rossii* bem como a interação entre tempo e órgão ($F=10.1$, $p=0,001$), temperatura e órgão ($F=1.87$, $p=0,036$) e tempo e temperatura ($F=7.03$, $p=0,001$) (Tabela 5). A interação entre os três fatores, tempo, temperatura e órgão ($F=2.27$, $p=0,001$) também influenciou o metabolismo energético (Tabela 6). O fator temperatura isoladamente não influenciou o metabolismo analisado (Tabela 6).

TABELA 6 – PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DO TEMPO, TEMPERATURA, TIPO DE ÓRGÃO E SUAS INTERAÇÕES NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM *Nothotenia rossii*

	GL	SQ	MS	F	R ²	p
Temperatura	1	0.0417	0.0417	0.929	0.00164	0.409
Tempo	3	2.4947	0.8316	18.541	0.09848	0.001
Órgão	3	11.1474	3.7158	82.848	0.44004	0.001
Temp X Tempo	3	0.9464	0.3155	7.034	0.03736	0.001
Temp X Órgão	3	0.2516	0.0839	1.870	0.00993	0.036
Tempo X Órgão	8	3.6247	0.4531	10.102	0.14308	0.001
TempoXTempXÓrgão	8	0.8162	0.1020	2.275	0.03222	0.001
Resíduos	134	6.0100	0.0449		0.23724	
Total	163	25.3327			1.00000	

LEGENDA: Efeitos da temperatura (05 °C/dia até alcançar as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C e 8 °C), tempo (T9, T13, T17, T21), tipo de órgão (brânquias, rim, fígado e encéfalo) e suas interações nas respostas de biomarcadores em *N. rossii*. GL= grau de liberdade; SQ= soma dos quadrados; MS= média da soma dos quadrados; Pseudo-F= valor F por permutação, * indica variação estatística significativa $p \leq 0,05$, valor p baseado em 999 permutações (o menor valor p possível é 0.001)

4.2 Análise de variância do metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes

Nas brânquias de *N. rossii* os biomarcadores agrupados como metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes foram alterados pelo tempo ($F=5.49$, $p=0,001$). O fator tempo e a interação entre tempo e temperatura não influenciaram os biomarcadores analisados (Tabela 7).

TABELA 7- PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO BRANQUIAL DE *Nothotenia rossii*

	GL	SQ	MS	F	R ²	p
Temperatura	1	0.01606	0.016063	0.8414	0.1259	0.4
Tempo	3	0.43896	0.146322	7.6645	0.34415	0.001*
Temp X Tempo	3	0.03774	0.012581	0.6590	0.02959	0.626
Resíduos	41	0.78273	0.019091		0.61366	
Total	48	1.2755			1.000	

LEGENDA: Efeitos da temperatura (05 °C/dia até alcançar as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C e 8 °C), tempo (T9, T13, T17, T21) e sua interação nas respostas de biomarcadores em *N. rossii*. GL= grau de liberdade; SQ= soma dos quadrados; MS= média da soma dos quadrados; Pseudo-F= valor F por permutação, * indica variação estatística significativa $p \leq 0,05$, valor p baseado em 999 permutações (o menor valor p possível é 0.001)

No rim de *N. rossii* os biomarcadores agrupados como metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes foram alterados pelo tempo ($F=5.49$, $p=0,001$). O fator tempo e a interação entre tempo e temperatura não influenciaram os biomarcadores analisados (Tabela 8).

TABELA 8 - PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO RENAL DE *Nothotenia rossii*

	GL	SQ	MS	F	R ²	p
Temperatura	1	0.03744	0.037445	0.8213	0.01523	0.507
Tempo	3	0.75124	0.250413	5.4923	0.30562	0.001*
Temp X Tempo	3	0.11922	0.039740	0.8716	0.04850	0.569
Resíduos	34	1.55017	0.045593		0.63065	
Total	41	2.45808			1.000	

LEGENDA: Efeitos da temperatura (05 °C/dia até alcançar as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C e 8 °C), tempo (T9, T13, T17, T21) e sua interação nas respostas de biomarcadores em *N. rossii*. GL= grau de liberdade; SQ= soma dos quadrados; MS= média da soma dos quadrados; Pseudo-F= valor F por permutação, * indica variação estatística significativa $p \leq 0,05$, valor p baseado em 999 permutações (o menor valor p possível é 0.001)

No fígado de *N. rossii* os biomarcadores agrupados como metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes foram alterados pelo tempo ($F=3.74$, $p=0,01$), pelo fator tempo ($F=2.35$, $p=0,012$) e pela interação entre tempo e temperatura ($F=3.26$, $p=0,001$) não (Tabela 9).

TABELA 9- PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO HEPÁTICO DE *Nothotenia rossii*

	GL	SQ	MS	F	R ²	p
Temperatura	1	0.13923	0.139227	3.7462	0.06738	0.010*
Tempo	3	0.26253	0.087509	2.3546	0.12706	0.012*
Temp X Tempo	3	0.36365	0.121217	3.2616	0.17600	0.001*
Resíduos	35	1.30078	0.037165		0.62956	
Total	42	2.06618			1.000	

LEGENDA: Efeitos da temperatura (05 °C/dia até alcançar as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C e 8 °C), tempo (T9, T13, T17, T21) e sua interação nas respostas de biomarcadores em *N. rossii*. GL= grau de liberdade; SQ= soma dos quadrados; MS= média da soma dos quadrados; Pseudo-F= valor F por permutação, * indica variação estatística significativa $p \leq 0,05$, valor p baseado em 999 permutações (o menor valor p possível é 0.001)

No encéfalo de *N. rossii* os biomarcadores agrupados como metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes foram alterados pelo tempo ($F=14.25$, $p=0,001$). O fator tempo e a interação entre tempo e temperatura não influenciaram os biomarcadores analisados (Tabela 10).

TABELA 10- PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E SUA INTERAÇÃO NO METABOLISMO OXIDATIVO E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO ENCEFÁLICO DE *Nothotenia rossii*

	GL	SQ	MS	F	R ²	p
Temperatura	1	0.0380	0.03805	0.8254	0.01025	0.427
Tempo	3	1.9718	0.65727	14.2585	0.53114	0.001*
Temp X Tempo	3	0.2735	0.09118	1.9780	0.07368	0.090
Resíduos	31	1.4290	0.04610		0.38493	
Total	38	3.7124			1.000	

LEGENDA: Efeitos da temperatura (05 °C/dia até alcançar as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C e 8 °C), tempo (T9, T13, T17, T21) e sua interação nas respostas de biomarcadores em *N. rossii*. GL= grau de liberdade; SQ= soma dos quadrados; MS= média da soma dos quadrados; Pseudo-F= valor F por permutação, * indica variação estatística significativa $p \leq 0,05$, valor p baseado em 999 permutações (o menor valor p possível é 0.001)

O fator tempo influenciou ($F=8.71$, $p=0,001$) (Tabela 12) o metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes de *N. rossii* quando considerados os tecidos branquial, renal, hepático e encefálico em conjunto. O fator órgão ($F=232.27$, $p=0,001$) também influenciou as respostas do metabolismo de *N. rossii* bem como a interação entre tempo e órgão ($F=8.27$, $p=0,001$) (Tabela 10). A interação entre os três fatores, tempo, temperatura e órgão ($F=2.01$, $p=0,001$) também influenciou o metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes (Tabela 11). O fator temperatura isoladamente não influenciou o metabolismo analisado, nem as interações entre tempo e temperatura, e temperatura e órgão (Tabela 11).

TABELA 11 – PERMANOVA SOBRE OS EFEITOS DO TEMPO, TEMPERATURA, TIPO DE ÓRGÃO E SUAS INTERAÇÕES NO METABOLISMO DE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES EM *Nothotenia rossii*

	GL	SQ	MS	F	R ²	p
Temperatura	1	0.069	0.0689	1.920	0.00199	0.084
Tempo	3	0.938	0.3128	8.771	0.02704	0.001
Órgão	3	25.018	8.3392	232.276	0.72108	0.001
Temp X Tempo	3	0.143	0.0478	1.331	0.00413	0.183
Temp X Órgão	3	0.140	0.0468	1.303	0.00404	0.197
Tempo X Órgão	9	2.673	0.2970	8.274	0.07706	0.001
TempoXTempXÓrgão	9	0.650	0.0723	2.013	0.01875	0.001
Resíduos	141	5.062	0.0359		0.14591	
Total	172	34.694			1.000	

LEGENDA: Efeitos da temperatura (05 °C/dia até alcançar as temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C e 8 °C), tempo (T9, T13, T17, T21) e sua interação nas respostas de biomarcadores em *N. rossii*. GL= grau de liberdade; SQ= soma dos quadrados; MS= média da soma dos quadrados; Pseudo-F= valor F por permutação, * indica variação estatística significativa $p \leq 0,05$, valor p baseado em 999 permutações (o menor valor p possível é 0.001)

5 DISCUSSÃO

O metabolismo de carboidratos nos órgãos analisados sofreu influência do tempo, temperatura e sua interação, tornando essa via metabólica vulnerável a aumentos graduais de temperatura.

Os diferentes órgãos analisados demonstram grandes quantidades fisiológica de energia requerida, demanda que fica ainda maior em situações de estresse térmico conforme visto no capítulo 1.

A brânquia é um órgão que necessita de altos níveis de ATP (TSENG; HUANG, 2008) por desempenhar trocas gasosas, regulação osmótica, mas principalmente, devido ao processo de regulação iônica que requer a síntese e funcionamento de várias enzimas e transportadores (JOHANSEN; PETTERSSON, 1981; MOMMSEN, 1984; TSENG, HUANG, 2008). Além disso as brânquias também sofrem influência do cortisol que tem atuação no metabolismo energético a fim de manter a homeostase gerando maior mobilização energética (MOMMSEN *et al.*, 1999).

A PFK foi o biomarcador que apresentou níveis elevados durante todo o período experimental (capítulo 1) e, provavelmente, foi essa enzima a responsável pelas alterações no metabolismo de carboidratos nas brânquias frente ao estresse térmico.

Outras enzimas sofreram influência da interação do tempo e temperatura no tecido encefálico, como a GP, LDH e G6Pase. O cérebro apresenta alta demanda energética devido ao mecanismo de processamento neural que inclui sistemas de sinalização de células, neurônios, circuitos e códigos neurais (LAUGHLIN *et al.*, 1998), tornando-o extremamente dependente de glicose como fonte primária de energia.

A alta demanda energética no fígado se deve às suas diversas funções fisiológicas como metabolismo de macronutrientes, suporte para o sistema imune, regulação do volume sanguíneo, metabolização de xenobióticos e síntese de proteínas (TREFTS *et al.*, 2017). Conforme capítulo 1, os biomarcadores LDH e lactato sofreram influência da interação entre tempo e temperatura nesse órgão, enquanto só a temperatura foi capaz de influenciar

os níveis de G6PDH, e provavelmente foram esses marcadores os responsáveis pela vulnerabilidade do fígado diante do estresse térmico.

O rim, único órgão que sofreu influência da temperatura isoladamente apresenta papel fundamental na osmorregulação e excreção (TSENG; HWANG, 2008). São também responsáveis pela produção hematopoiética, imunológica, hormonal (BARTON, 2002; MARSHALL; GROSSELL, 2006; ENGELUND; MADSEN, 2011) e apresenta importante papel na regulação metabólica. Atividades que exigem grandes quantidades de energia, sobretudo o importante papel do rim na manutenção do fornecimento de energia para outros tecidos, como visto no capítulo 1.

Quanto a resposta a espécies reativas nos órgãos analisados, sabe-se que peixes antárticos, naturalmente, possuem a habilidade de viverem em ambientes com maior concentração de oxigênio tecidual e de espécies reativas de oxigênio uma vez que a alta solubilidade de oxigênio nas águas frias da Antártica propicia maior produção de EROs nos tecidos e fluidos corporais (ABELE; PUNTARULO, 2004).

Outras características contribuem para essa situação, uma delas é a elevada densidade mitocondrial nesses animais (GUDERLEY, 2004; URSCHER; O'BRIEN, 2009; ENZOR; PLACE, 2014; WINDISCH *et al.*, 2014), outra é o fato de que peixes antárticos apresentam um elevado grau de insaturação lipídica para facilitar a difusão de oxigênio a baixas temperaturas (SIDELL, 1998; ENZOR; PLACE, 2014) além dos altos níveis constitutivos de enzimas antioxidantes (JOHNSTON *et al.*, 1998; ABELE; PUNTARULO, 2004),

. Essas características tornam o sistema de defesa antioxidante diferenciado e mais eficiente que o apresentado por peixes tropicais ou temperados (ABELE; PUNTARULO, 2004; GRIM *et al.*, 2013).

Nos órgãos analisados neste trabalho, brânquias, rim e encéfalo o metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes não sofreu influência da temperatura e de sua interação com o tempo. Esses resultados estão de acordo com a aumentada habilidade do sistema de defesa antioxidante em proteger moléculas contra os danos oxidativos em peixes antárticos de sangue-vermelho (CHEN *et al.*, 2008; GIESEG *et al.*, 2010; MUELLER *et al.*, 2012).

As brânquias, em seu estado fisiológico normal, apresentam elevada taxa metabólica, podendo consumir até 20% do total de oxigênio captado para manutenção do seu próprio metabolismo (HWANG *et al.*, 2011). O que pode lhe conferir maior habilidade de conviver com maiores concentrações de EROs.

Em estudo realizados em brânquias de peixes antárticos as alterações em biomarcadores do sistema oxidativo e de defesas antioxidantes frente ao aumento temperatura parecem ser ausentes ou pontuais e transientes (BUCKLEY; SOMERO, 2009; ENZOR; PLACE, 2014; FORGATI *et al.*, 2017; KLEIN *et al.*, 2017). Forgati *et al.* (2017) observou aumentos na concentração de GSH e da atividade CAT em até 12 horas de experimento.

Em outros estudos de estresse térmico também se observou apenas efeitos pontuais da temperatura no metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes, em diferentes tecidos de *N. rossii* e outros peixes antárticos (ALMROTH *et al.*, 2015; FORGATI *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2014; PRZEPIURA *et al.*, 2019).

O dano oxidativo frente à temperatura também não foi observado no encéfalo de *N. rossii* (KLEIN *et al.*, 2017; PRZEPIURA *et al.*;2019). Isso está de acordo com o fato de que esse tecido possui uma alta proteção constitutiva contra danos oxidativos (CHEN *et al.* 2008). Klein *et al.* (2017) observaram que a capacidade antioxidante contra radicais peroxil (ACAP) foi maior em brânquias e encéfalo que nos demais tecidos analisados.

Em contraste, o metabolismo oxidativo no fígado de *N. rossii* também foi influenciado pela temperatura isoladamente. No modelo de choque térmico, Machado *et al.* (2014) apontaram que no fígado de *N. rossii* a temperatura influenciou apenas a concentração de GSH, e a interação entre tempo e temperatura influenciou a concentração de GSH e MDA. Os demais biomarcadores analisados sofreram apenas influência do tempo.

No entanto, em aclimações a longo prazo outras espécies antárticas alterações no metabolismo oxidativo foram mais persistentes, apresentaram elevação constante da LPO, configurando uma resposta CRS elevada, em decorrência ao aumento de temperatura (ALMROTH *et al.*, 2015; HEISE *et al.*, 2007) corroborando com os resultados obtidos no capítulo 2.

É possível que o aumento gradual de temperatura possa causar mais danos oxidativos no fígado em comparação à modelos de estresse agudo, sobretudo por sua à vulnerabilidade ao processo de LPO já que este é um processo cíclico deflagrando uma reação oxidativa em cadeia (HALIWEEL; GUTTERIDGE., 2007).

Estudos analisando o metabolismo de peixes antárticos submetidos a estresse térmico estão sendo realizados e demonstram que as respostas podem ser espécie-específicas e tecido-específicas (MUELLER *et al.*, 2012, 2014; MACHADO *et al.*, 2014; SATTIN *et al.*, 2015; FORGATI *et al.*, 2017; KLEIN *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018)

6 CONCLUSÃO

As diferentes respostas frente ao estresse térmico (intensidade e tempo) entre os diferentes metabolismos analisados provavelmente, devem estar associados às características fisiológicas e adaptativas de *N. rossii*, como à alta densidade mitocondrial, alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados e de enzimas antioxidantes constitutivas

Frente ao calor, o fígado foi o único órgão a apresentar alteração, provavelmente pelo seu conteúdo lipídico estar vulnerável à lipoperoxidação que é um grave dano à célula, considerado como principal fator de morte celular.

A temperatura e sua associação com o tempo é capaz de influenciar o requerimento energético levando o organismo à respostas compensatórios e reorganização do metabolismo. No entanto, em aumentos graduais de temperatura o rim parece apresentar maior vulnerabilidade ao calor possivelmente pois, além de fisiologicamente apresentar elevada demanda energética, tem importante papel como exportador de energia frente ao estresse térmico.

7 REFERÊNCIAS

ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 138, n. 4, p. 405–415, 2004.

ALMROTH, B.C.; ASKER, N.; WASSMUR, B.; ROSENGREN, M.; JUTFELT, F.; GRÄNS, A.; SUNDELL, K.; AXELSSON, M.; STURVE, J. Warmer water temperature results in oxidative damage in an antarctic fish, the bald notothen. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 468, p. 130–137, 2015.

ANDREEVA, A. M. The role of structural organization of blood plasma proteins in the stabilization of water metabolism in bony fish (Teleostei). **Journal of Ichthyology**, v. 50, n. 7, p. 552–558, 2010.

BALDWIN, J.; ELIAS, J. P.; WELLS, R. M. G.; DONOVAN, D. A. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: comparisons with temperate abalone species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 342, p. 213–225, 2007.

BARTON, B. A. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517–525, 2002.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, p.160, 1975.

BIDINOTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico CEPTA Pirassununga** v. 10, p. 53-60, 1997.

BUCKLEY, B. A.; SOMERO, G. N. cDNA microarray analysis reveals the capacity of the cold-adapted Antarctic fish *Trematomus bernacchii* to alter gene expression in response to heat stress. **Polar Biology**. v. 32, p. 403-415, 2009.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p.5475–5480, 1975.

CIARDELLO, M.; CAMARDELLA, L.; DI PRISCO, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two Antarctic teleosts: correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1250, p. 76–82, 1995.

CHANG, J. C.-H.; WU, S.-M.; TSENG, Y.-C.; LEE, Y.-C.; BABA, O.; HWANG, P.-P. Regulation of glycogen metabolism in gills and liver of the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during acclimation to seawater. **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 3494-3504, 2007

CHEN, Z.; CHENG, C. H.; ZHANG, J.; CAO, L.; CHEN, L.; ZHOU, L.; JIN, Y.; YE, H.; DENG, C.; DAI, Z.; XU, Q.; HU, P.; SUN, S.; SHEN, Y.; CHEN, L. Transcriptomic and genomic evolution under constant cold in Antarctic notothenioid fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 35, p. 12944-12949, 2008.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, p. 273-283, 1979.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. C.; KINSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30: p. 235-241, 1981.

DONATTI, L.; FANTA, E. Influence of photoperiod on visual prey detection in the Antarctic fish *Nothotenia neglecta* Nybelin. **Antarctic Science** v. 14, p. 146–150, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-335, 1956.

ENGELUND, M. B.; MADSEN, S. S. The role of aquaporins in the kidney of euryhaline teleosts. **Frontiers in Physiology**, v. 2, p. 51, 2011.

ENZOR, L. A.; PLACE, S. P. Is warmer better? Decreased oxidative damage in notothenioid fish after long-term acclimation to multiple stressors. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 18, p. 3301–3310, 2014.

FATHI, A. R.; KRAUTHEIM, A.; LUCKE, S.; BECKER, K.; STEINFELDE, R. H. J. Nonradioactive technique to measure protein phosphatase 2A-like activity and its inhibition by drugs in cell extracts. **Analytical Biochemistry**, v. 310, n. 2, p. 208-214, 2002.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J., HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415-430, 2007.

FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; MACHADO, C.; SOUZA, M. R. D. P.; DONATTI, L. Effects of heat stress on the renal and branchial carbohydrate metabolism and antioxidant system of Antarctic fish. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 0, n. 0, p. 1–18, 2017.

GRIM, J. M.; Simonik, E. A.; Semones, M. C.; Kuhn, D. E.; Crockett, E. L. The glutathione-dependent system of antioxidant defense is not modulated by temperature acclimation in muscle tissues from striped bass, *Morone saxatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 164, n. 2, p. 383-390, 2013.

GUDERLEY, Helga. Metabolic responses to low temperature in fish muscle. **Biological reviews**, v. 79, n. 2, p. 409-427, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, Oxford, 2007.

HARROWER, J.R.; BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 32, p. 224-228, 1972.

HEISE, K., ESTEVEZ, M. S., PUNTARULO, S., GALLEANO, M., NIKINMAA, M., PORTNER, H. O.; ABELE, D. Effects of seasonal and latitudinal cold on oxidative stress parameters and activation of hypoxia inducible factor (HIF-1) in zoarcid fish. **Journal of Comparative Physiology, Part B**. v. 177, p. 765-777, 2007.

HWANG, P.-P.; LEE, T.-H.; LIN, L. Y. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative and Physiology**. v. 301, p. R28–R47, 2011.

JAYASUNDARA, N.; HEALY, T. M.; SOMERO, G. N. Effects of temperature acclimation on cardiorespiratory performance of the Antarctic notothenioid *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v. 36, n. 7, p. 1047–1057, 2013.

JOHANSEN, K.; PETTERSSON, K. Gill O₂ consumption in a teleost fish, *Gadus morhua*. **Respiration Physiology**. v. 44, p. 277-284, 1981.

KANDALSKI, P.K.; SOUZA, M. R. D. P.; HERRERIAS, T.; MACHADO, C., ZALESKI, T., FORGATI, M.; GUILLEN, A.C.; VIANA, D.; MOURA, M.; DONATTI, L. Effects of short-term thermal stress on the plasma biochemical profiles of two Antarctic nototheniid species. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 2018

KANDALSKI, P.K.; ZALESKI, T.; FORGATI, M.; BADUY, F.V.S.; SANTOS, D.E.; MACHADO, C.; DMENGEON, M.R.P.S.; PIECHNIK, C.; FÁVARO, L.; DONATTI, L. Effect of long-term thermal challenge on the Antarctic notothenioid *Nothotenia rossii*. **Fish Physiology and Biochemistry**. p.1-17, 2019.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for Several Activities of the Glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KLEIN, R. D.; ROSA, C. E.; COLARES, E. P.; ROBALDO, R. B.; MARTINEZ, P. E.; BIANCHINI, A. Antioxidant defense system and oxidative status in Antarctic fishes: The sluggish rockcod *Nothotenia coriiceps* versus the active marbled notothen *Nothotenia rossii*. **Journal of Thermal Biology**, v. 68, n. February, p. 119–127, 2017

LAUGHLIN S. B.; STEVENINCK, R. R. DE R. V.; ANDERSON, J. C. The metabolic cost of neural information. **Neuroscience**, v.1, n.1, 1998.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**. v. 233, p. 346–357, 1994.

LOGAN, C. A.; SOMERO, G. N. Transcriptional responses to thermal acclimation in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper 1864). **American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology** .v. 299, 2010

LOGAN, C. A.; SOMERO, G. N. Effects of thermal acclimation on transcriptional responses to acute heat stress in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper). **American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**. v.300, 2011

LU, G. D. The metabolism of piruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood piruvate. **Biochemical Journal**, v. 33, p. 249-254, 1939.

MACHADO, C.; ZALESKI, T.; RODRIGUES, E.; CARVALHO, C. dos S.; CADENA, S. M. S. C.; GOZZI, G. J.; KREBSBACH, P.; RIOS, F. S. A.; DONATTI, L. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 172–173, n. 1, p. 21–28, 2014.

MADEIRA, C.; MADEIRA, D.; DINIZ, M.S.; CABRAL, H.N.; VINAGRE, C. Thermal acclimation in clown fish and multi-tissue experimental approach. **Ecological Indicators**. v.71, p.280-292, 2016.

MARSHALL, W. S.; GROSELL, M. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. **The Physiology of fishes**, v. 3, p. 177-230, 2006.

MOMMSEN, T. P. Metabolism of the Fish Gill. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (eds) **Fish Physiology**. Vol. XB. Orlando: Academic Press, 1984. p. 203-237.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, n. 3, p. 211–268, 1999.

MUELLER, I. A.; DEVOR, D. P.; GRIM, J. M.; BEERS, J. M.; CROCKETT, E. L.; O'BRIEN, K. M. Exposure to critical thermal maxima increases oxidative stress in hearts of white- but not red-blooded Antarctic notothenioid fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 20, p. 3655–3664, 2012

PECK, L.S.; CLARK, M.S.; MORLEY, S.A.; MASSEY, A.; ROSSETTI, H. Animal temperature limits and ecological relevance: effects of size, activity and rates of change. **British Ecological Society: Functional Ecology**. v.3, n.2, p.248-256, 2009.

PECK, L.S. Organisms and responses to environmental change. **Marine Genomics**. v. 4, p. 237-243, 2011.

PECK, S.L.; MORLEY, S.A.; RICHARD, J.; CLARK, M.S. Acclimation and thermal tolerance in Antarctic marine ectotherms. **Journal of Experimental Biology**. v.217, p.16-22. 2014.

PERES, H.; COSTAS, B.; PEREZ-JIMENEZ, A.; GUERREIRO, I.; OLIVATELES, A. Reference values for selected hematological and serum biochemical parameters of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles under intensive aquaculture conditions. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 31, n. 1, p. 65–71, 2015.

PRZEPIURA, T.C.S.; HERRERIAS, T.; KANDALSKI, P.K.; ZALESKI, T.; MACHADO, C.; FORGATI, M.; DONATTI, L. Metabolic responses in Antarctic Nototheniidae brains subjected to thermal stress. **Brain Research**. 2019

RODRIGUES JR, E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M.; SUDA, C. N. K.; VANI, G. S.; DONATTI, L.; RODRIGUES, E.; LAVRADO, H. P. Metabolic responses of the Antarctic fishes *Nothotenia rossii* and *Nothotenia coriiceps* to sewage pollution. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1205–1220, 2015.

SABOROWSKI, I. R.; BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, v. 140, p. 557-565, 2002.

SATTIN, G.; BAKIU, R.; TOLOMEO, A. M.; CARRARO, A.; COPPOLA, D.; FERRO, D.; SANTOVITO, G. Characterization and expression of a new cytoplasmic glutathione peroxidase 1 gene in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Hydrobiologia**, v.761, n.1,p. 363-372, 2015.

SEEBACHER, F.; WHITE, C.R.; FRANKLIN, C.E. Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. **Nature Climate Change**. v.5, p.61-66, 2015.

SEDILAK, J.; LINDSAY, R.H.C. Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. **Analytical Biochemistry**, 25: 192–205, 1968.

SOUZA, M. R. D. P.; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; MACHADO, C.; SILVA, D. T.; PIECHNIK, C. A.; MOURA, M. O.; DONATTI, L. Heat stress in the heart and muscle of the Antarctic fishes *Nothotenia rossii* and *Nothotenia coriiceps*: Carbohydrate metabolism and antioxidant defence. **Biochimie**, v. 146, p. 43-55, 2018.

SUNDAY, J.M.; BATES, A.E.; KEARNEY, M.R.; COLWELL, R.K.; DULVY, N.K.; LONGINO, J.T.; HUEY, R.B. Thermal-safety margins and the necessity of thermoregulatory behavior across latitude and elevation. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 111, n.15. p. 5610-5615, 2014.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.85, n.3, p.603-611, 2005.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASEERMAN, D.H.; The liver. **Current Biology**. v.27, n.21, p.1147-1151, 2017.

TSENG, Y. C.; HWANG, P. P. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, n. 4, p. 419-429, 2008.

URSCHEL, M. R.; O'BRIEN, K. M. Mitochondrial function in Antarctic notothenioid fishes that differ in the expression of oxygen-binding proteins. **Polar biology**, v. 32, n. 9, p. 1323-1330, 2009.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**.v.77: p.325-333, 1981.

WINDISCH, H. S.; FRICKENHAUS, S.; JOHN, U.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. O.; LUCASSEN, M. Stress response or beneficial temperature acclimation: Transcriptomic signatures in Antarctic fish (*Pachycara brachycephalum*). **Molecular Ecology**, v. 23, n. 14, p. 3469–3482, 2014

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**. v. 60, p. 340–347, 2002.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do capítulo I demonstram que *Nothotenia rossii* frente ao aumento gradual de temperatura apresenta desequilíbrio energético evidenciado por alterações metabólicas compensatórias visando suprir os requisitos energéticos. O aumento gradual de temperatura foi capaz de deflagrar respostas diferentes aos modelos de choque térmico e as respostas foram tecidos específicas. O rim apresentou importante papel como exportador de glicose e por fim, viu-se que a demanda energética continuou persistente apesar dos mecanismos compensatórios.

O capítulo II verificou a influência do estresse térmico gradual na defesa antioxidante de *N. rossii*. O aumento gradual de temperatura deflagrou respostas principalmente em brânquias e fígado, e nesse último os danos observados foram persistentes, demonstrando sua vulnerabilidade à lipoperoxidação. As alterações plasmáticas ocorrem apenas na diminuição da concentração de proteínas totais e globulinas, os demais parâmetros mantiveram seus níveis estáveis e, por serem rapidamente lançados no plasma, não parecer ser marcadores adequados para modelos de aumentos graduais. Também se observou aumento da H⁺-ATPase renal. Os resultados em conjunto podem ser respostas em decorrência a um desequilíbrio no pH. As respostas foram tecido-específicas.

O capítulo III forneceu informações a respeito dos efeitos do estresse térmico gradual em *N. rossii*, com uma visão que permitiu a integração dos biomarcadores estudados. Tendo isso em vista, a temperatura em interação com o tempo afetou o metabolismo energético de todos os órgãos analisados, com exceção do rim que sofreu também efeito isolado da temperatura, e essa vulnerabilidade deve ser em decorrência de sua natural demanda energética ainda aumentada devido ao seu papel de exportador de glicose. O metabolismo oxidativo sofreu apenas influência do tempo possivelmente por ser robusto o suficiente devido às características fisiológicas de *N. rossii*. O único órgão que sofreu influência da temperatura foi o fígado já que este apresentou danos persistentes de lipoperoxidação.

Os resultados obtidos nesta tese fornecem informações a respeito dos mecanismos fisiológicos deflagrados em *N. rossii* frente ao estresse térmico gradual, mostrando que essa espécie apresenta certa plasticidade, mesmo que parcial, para lidar com o estresse térmico nessa magnitude, contribuindo assim, para a obtenção de dados científicos que visam detectar e estimar os efeitos do estresse térmico com taxas menores de aquecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABELE, D.; BURLANGO, B.; VIARENGO, A.; PÖRTNER, H.O. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. **Comparative Biochemical Physiology part B**. v. 120, p.425 -435, 1998

ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 138, n. 4, p. 405–415, 2004.

ADAMU, K. M.; KORI-SIAKPERE, O. Effects of sublethal concentrations of tobacco (*Nicotiana tobaccum*) leaf dust on some biochemical parameters of Hybrid catfish (*Clarias gariepinus* and *Heterobranchus bidorsalis*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 1, p. 183–196, 2011.

AFONSO, L. O. B.; HOSOYA, S.; OSBORNE, J.; GAMPERL, A.K; JOHNSON, S. Lack of glucose and hsp70 responses in haddock *Melanogrammus aeglefinus* (L.) subjected to handling and heat shock. **Journal of Fish Biology**. v. 72, p. 157-167, 2008.

ALMROTH, B. C.; ASKER, N.; WASSMUR, B.; ROSENGRE, M.; JUTFELE, F.; GRÄNS, A.; SUNDELL, K.; AXELSSON, M.; STURVE, J. Warmer water temperature results in oxidative damage in an Antarctic fish, the bald notothen. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 468, p. 130–137, 2015.

ANDERSON, M. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**. v.26, p.32 – 46, 2011.

ANDREEVA, A. M. The role of structural organization of blood plasma proteins in the stabilization of water metabolism in bony fish (Teleostei). **Journal of Ichthyology**, v. 50, n. 7, p. 552–558, 2010.

ANGILLETTA, M.J.JR. A Theoretical and Empirical Synthesis. Oxford University Press, New York. 2009.

ANSALDO M, LUQUET CM, EVELSON PA, POLO JAM, LLESUY S.: Antioxidant levels from different Antarctic fish caught around South Georgia Island and Shag Rocks. **Polar Biology**, v. 23, p.160 – 165, 2000.

ATKINSON, A.; SIEGEL, V.; PAKHOMOV, E.; ROTHERY, P. Long-term decline in krill stock and increase in salps within the Southern Ocean. **Nature**. v.432, p.100-103.2004.

BALDWIN, J.; ELIAS, J.P.; WELLS, R.M.G; DONOVAN, D.A. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: comparisons with temperate abalone species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v.342, p.213–225, 2007.

BARNES, D. K. A.; FUENTES, V.; CLARKE, A.; SCHLOSS, I. R.; WALLACE, M. I. Spatial and temporal variation in shallow seawater temperatures around Antarctica. **Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 53, n. 8-10, p. 853-865. 2006.

BARRERA-ORO, E. R. Review: the role of fish in the Antarctic marine food web: differences between inshore and offshore waters in the southern Scotia Arc and west Antarctic Peninsula. **Antarctic Science**, v. 14, p.293–309, 2002.

BARRERA-ORO, E.R.; WINTER, D.J. Age composition and feeding ecology of early juvenile *Nothotenia rossii* (Pisces, Nototheniidae) at Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctic. **Antarctic Science**, v.20, n.4, p.339-341, 2008.

BASU, N.; TODGHAM, A. E.; ACKERMAN, P. A.; BIBEAU, M. R.; NAKANO, K.; SCHULTE, P. M.; IWAMA, K. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. **Gene**. v. 295, p. 173-183, 2002.

BARTON, B.A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v.42 n.3, p.517-525, 2002.

BEERS, J. M.; JAYASUNDARA, N.. Antarctic notothenioid fish: what are the future consequences of 'losses' and 'gains' acquired during long-term evolution at cold and stable temperatures?. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 12, p. 1834-1845, 2015.

BEGG, K.; PANKHURST, N.W.; Endocrine and metabolic responses to stress in laboratory population of the tropical damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. **Journal of fish Biology**. v. 64 (1), p. 133-145, 2004

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, p.160, 1975.

BIDINOTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico CEPTA Pirassununga** v. 10, p. 53-60, 1997

BILYK, K. T.; DE VRIES, A. L. Heat tolerance and its plasticity in Antarctic fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 158, p. 382-90, 2011.

BEUTLER, E. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. New York: Grune & Stratton, p.160, 1975.

BONGA, S. E. W. The stress response in fish. **Physiological Reviews**. v. 77, p. 591- 625, 1997.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of rotein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRETON, S. and BROWN, D. New insights into the regulation of V-ATPase-dependent proton secretion. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, vol. 292 (1), p. 1-10. 2000.

BRODTE, E.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. O.; ARNTZ, W. E. Biology of the Antarctic eelpout *Pachycara brachycephalum*, **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**. v. 53, 1.8–10, p. 1131-1140, 2006.

BUCKLEY, B. A.; PLACE, S. P.; HOFMANN, G. E. Regulation of heat shock genes in isolated hepatocytes from an Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*. **Journal of Fish Biology**, v.207, p.3649–3656, 2004.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p.5475–5480, 1975.

CHAPMAN, W.L.; WALSH, J.E. A synthesis of antarctic temperature. **Journal of Climate**. v. 20, p.4096-4117, 2007.

CHANG, J. C.-H.; WU, S.-M.; TSENG, Y.-C.; LEE, Y.-C.; BABA, O.; HWANG, P.-P. Regulation of glycogen metabolism in gills and liver of the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during acclimation to seawater. **The Journal of Experimental Biology**. v. 210, p. 3494-3504, 2007.

CHENG, C.H.; CHEN, L.; NEAR, T. J.; JIN, Y. Functional antifreeze glycoprotein genes in temperate-water New Zealand nototheniid fish infer an Antarctic evolutionary origin. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 11, p.1897-1908, 2003.

CHEN, Z.; CHENG, C. H.; ZHANG, J.; CAO, L.; CHEN, L.; ZHOU, L.; JIN, Y.; YE, H.; DENG, C.; DAI, Z.; XU, Q.; HU, P.; SUN, S.; SHEN, Y.; CHEN, L. Transcriptomic and genomic evolution under constant cold in Antarctic nototheniid fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 35, p. 12944-12949, 2008.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, p. 273-283, 1979.

CIARDELLO, M.; CAMARDELLA, L.; DI PRISCO, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two Antarctic teleosts: correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1250, p. 76-82, 1995.

COMISO, J.C. Large decadal decline of the arctic multiyear ice cover. **Journal of Climate**. v. 25, p. 1176-1193. 2012

CONVEY, P.; BINDSCHADLER, R.; DI PRISCO, G.; FAHRBACH, E.; GUTT, J.; HODGSON, D.A.; MAYEWSKI, P.A.; SUMMERHAYES, C. P.; TURNER, J. Antarctic climate change and the environment. **Antarctic Science**. v. 21, p. 541- 563, 2009.

COOK, A. J.; HOLLAND, P. R.; MEREDITH, M. P.; MURRAY, T.; LUCKMAN, A.; VAUGHAN, D. G. Ocean forcing of glacier retreat in the western Antarctic Peninsula. **Science**, v. 353, n. 6296, p. 283-286, 2016.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. C.; KINSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30: p. 235-241, 1981.

DE ANGELIS, H.; SKVARCA, P. Glacier surge after ice shelf collapse. **Science**. v. 299, p. 1560-1562. 2003.

DE VRIES, A.L.; CHENG, C.H. Antifreeze proteins and organismal freezing avoidance in polar fishes. In *Fish Physiology Series, the Physiology of Polar Fishes*, Vol. 22 (ed. A. P. Farrell and J. F. Steffenson), pp. 155-201. San Diego, CA: Elsevier Academic Press. 2005.

DE VRIES, A.L.; CHENG, C.H.C. Antifreeze proteins and organismal freezing avoidance in polar fishes. **Fish Physiology**. v. 22, p. 155-201, 2005.

DIENEL, G.A.; CRUZ, N.F. Contributions of glycogen to astrocytic energetics during brain activation. **Metabolic Brain Disease**. v. 30, p. 281-298, 2014.

DI PRISCO, G.; COCCA, E.; PARKER, S.K.; DETRICH, H.W. Tracking the evolutionary loss of hemoglobin expression by the white-blooded Antarctic icefishes. **Gene**. v. 295, p. 185-191. 2002.

DONATTI, L.; FANTA, E. Influence of photoperiod on visual prey detection in the Antarctic fish *Nothotenia neglecta* Nybelin. **Antarctic Science** v. 14, p. 146-150, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-335, 1956.

DUARTE, R.M., FERREIRA, M.S.; WOOD, C.M.; VAL A.L. Effect of low pH on Na⁺ regulation in two cichlid fish species of the Amazon. **Comparative Biochemistry and Physiology part A: Molecular & Integrative Physiology**. v. 166, n.3, p. 441-448, 2013.

DUHAMEL, G.; HULLEY, P. A.; CAUSSE, R.; KOUBBI, P.; VACCHI, M.; PRUVOST, P. et al. In DE BROYER, C.; KOUBBI, P.; GRIFFITHS, H. J.; RAYMOND, B.; UDEKEM D'ACOS, C. et al. (eds.). **Biogeographic Atlas of the Southern Ocean**. Scientific Committee on Antarctic Research, Cambridge, pp. 328-362, 2014

EASTMAN, J.T. **Antarctic Fish Biology: Evolution in a Unique Environment**. San Diego: Academic Press, 1993.

EKAU, W. Morphological Adaptations and Mode of Life in High Antarctic Fish. In: DI PRISCO, G., Maresca, B., Tota, B. Biology of Antarctic Fish. **Berlin: Springer- Verlag**, p.23-29, 1991.

ENGELUND, M. B.; MADSEN, S. S. The role of aquaporins in the kidney of euryhaline teleosts. **Frontiers in Physiology**, v. 2, p. 51, 2011.

ENES, P., PANSERAT, S.; KAUSHIK, S.; OLIVA-TELES, A. Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular Integrative Physiology**. p. 89-96, 2006.

ENZOR, L.A.; HUNTER, E.M.; PLACE, S.P. The effects of elevated temperature and ocean acidification on the metabolic pathways of notothenioid fish. **Conservation physiology**. v.5, n.1, 2017

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**. v. 85, p. 97-177. 2005.

FATHI, A. R.; KRAUTHEIM, A.; LUCKE, S.; BECKER, K.; STEINFELDE, R. H. J. Nonradioactive technique to measure protein phosphatase 2A-like activity and its inhibition by drugs in cell extracts. **Analytical Biochemistry**, v. 310, n. 2, p. 208-214, 2002.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J., HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415-430, 2007.

FLOWER, B.P.; KENETT, J.P. (1994) The middle Miocene climatic transition: East Antarctic ice sheet development, deep ocean circulation and global carbon cycling. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**. v.108, p. 537-555, 1994.

FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; MACHADO, C.; SOUZA, M. R. D. P.; DONATTI, L. Effects of heat stress on the renal and branchial carbohydrate metabolism and antioxidant system of Antarctic fish. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 0, n. 0, p. 1-18, 2017.

FOSTER, T. D. The marine environment. In: LAWS, R.M. (Ed.) **Antarctic ecology**. London: Academic Press, v. 2, p.345-371, 1984

HARROWER, J.R.; BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 32, p. 224-228, 1972.

GIBBS, A.; SOMERO, G. N. Pressure adaptations of Na⁺ /K⁺ -ATPase in gills of marine teleosts. **The Journal of Experimental Biology**. v. 143, p. 475-492, 1989.

GIESEG, S. P.; CUDDIHY, S.; HILL, J. V.; DAVISON, W. A comparison of plasma vitamin C and E levels in two Antarctic and two temperate water fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. v. 125, p. 371-378, 2000.

GON, O.; HEEMSTRA, P. C. Fishes of the Southern Ocean. **Institute of Ichthyology**, v.462, 1990.

GONZALEZ-CABRERA, P. J.; DOWD, F.; PEDIBHOTLA, V. K.; ROSARIO, R.; STANLEY-SAMUELSON, D.; PETZEL, D. Enhanced hypo-osmoregulation induced by warm-acclimation in antarctic fish is mediated by increased gill and kidney Na⁺ /K⁺ -ATPase activities. **The Journal of experimental biology**, v. 198, n. Pt 11, p. 2279-2291, 1995.

GOSH, A.; CHEUNG, Y.Y.; MANSFIELD, B,C.; CHOU, J.Y. Brain Contains a Functional Glucose-6-Phosphatase Complex Capable of Endogenous Glucose Production. **Journal of Biological Chemistry**. v. 280, p. 11114-11119, 2005.

GRIM, J. M.; Simonik, E. A.; Semones, M. C.; Kuhn, D. E.; Crockett, E. L. The glutathione-dependent system of antioxidant defense is not modulated by temperature acclimation in muscle tissues from striped bass, *Morone saxatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 164, n. 2, p. 383-390, 2013.

GUDERLEY, Helga. Metabolic responses to low temperature in fish muscle. **Biological reviews**, v. 79, n. 2, p. 409-427, 2004.

GUDERLEY, H.; ST-PIERRE, J. Going with the flow in the fast lane: contrasting mitochondrial responses to thermal change. **The Journal of Experimental Biology**. v. 205, p. 2237-2249, 2002.

GUYNN, S.; DOWD, F.; PETZEL, D. Characterization of gill Na/K-ATPase activity and ouabain binding in Antarctic and New Zealand nototheniid fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 131, n. 2, p. 363-374, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, Oxford, 2007.

HARROWER, J.R.; BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 32, p. 224-228, 1972.

HEISE, K.; PUNTARULO, S.; PÖRTNER, H. O.; ABELE, D. (2003). Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula 102 elliptica* (King and Broderip) under heat stress. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 134, p. 79-90, 2003.

HEISE, K., ESTEVEZ, M. S., PUNTARULO, S., GALLEANO, M., NIKINMAA, M., PORTNER, H. O.; ABELE, D. Effects of seasonal and latitudinal cold on oxidative stress parameters and activation of hypoxia inducible factor (HIF-1) in zoarcid fish. **Journal of Comparative Physiology, Part B**. v. 177, p. 765-777, 2007.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. **Functional metabolism: Regulation and adaptation**, v. 1, p. 319-66, 2004.

HOFMANN, G.E.; LUND, S.G.; PLACE, S.P.; WHITMER, A.C. Some like it hot, some like it cold: the heat shock response is found in New Zealand but not Antarctic notothenioid fishes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**.v.316 p.79-89, 2005

HUEY, R.B.; STEVENSON, R.D. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: A Discussion of Approaches. **American Zoologist**. v.19, p. 357-366, 1979

HUDSON, H. A.; BRAUER, P. R.; SCOFIELD, M. A.; PETZEL, D. H. Effects of warm acclimation on serum osmolality, cortisol and hematocrit levels in the Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v. 31, n. 8, p. 991–997, 2008.

HWANG, P.-P.; LEE, T.-H.; LIN, L. Y. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative and Physiology**. v. 301, p. R28–R47, 2011.

JAYASUNDARA, N.; HEALY, T. M.; SOMERO, G. N. Effects of temperature acclimation on cardiorespiratory performance of the Antarctic notothenioid *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v. 36, n. 7, p. 1047–1057, 2013.

JIN, Y.; DEVRIES, A. L. Antifreeze glycoprotein levels in Antarctic notothenioid fishes inhabiting different thermal environments and the effect of warm acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**. v.144, n.3, p. 290-300, 2006.

JOHANSEN, K.; PETTERSSON, K. Gill O₂ consumption in a teleost fish, *Gadus morhua*. **Respiration Physiology**. v. 44, p. 277-284, 1981.

JOHNSON, T.P; BENNETT, A.F. The thermal acclimation of burst escape performance in fish: an integrated study of molecular and cellular physiology and organismal performance. **Journal of Experimental Biology**.v.198, p. 2165-2175,1995.

JOUGHIN, I.; SMITH, B.E.; MEDLEY, B. Marine ice sheet collapse potentially underway for the Thwaites glacier basin, west Antarctica. **Science**. v.344, n. 6185, p.735-738, 2014.

KANDALSKI, P.K.; SOUZA, M. R. D. P.; HERRERIAS, T.; MACHADO, C., ZALESKI, T., FORGATI, M.; GUILLEN, A.C.; VIANA, D.; MOURA, M.; DONATTI, L. Effects of short-term thermal stress on the plasma biochemical profiles of two Antarctic nototheniid species. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 2018

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for Several Activities of the Glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KELLER, M.; SOMMER, A. M.; PÖRTNER, H. O.; ABELE, D. Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm

(*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 2529-2538, 2004.

KIRCHNER, S.; PANSERAT, S.; LIM, P.L.; KAUSHIK, S.; FERRARIS, R.P. The role of hepatic, renal and intestinal gluconeogenic enzymes in glucose homeostasis of juvenile rainbow trout. **Journal of Comparative Physiology part B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.** v. 178, p. 429-438, 2008.

KLEIN, R. D.; ROSA, C. E.; COLARES, E. P.; ROBALDO, R. B.; MARTINEZ, P. E.; BIANCHINI, A. Antioxidant defense system and oxidative status in Antarctic fishes: The sluggish rockcod *Nothotenia coriiceps* versus the active marbled notothen *Nothotenia rossii*. **Journal of Thermal Biology**, v. 68, n. February, p. 119–127, 2017.

KLEIN, R. D.; BORGES, V. D.; ROSA, C. E.; COLARES, E. P.; ROBALDO, R. B.; MARTINEZ, P. E.; BIANCHINI, A. Effects of increasing temperature on antioxidant defense system and oxidative stress parameters in the Antarctic fish *Nothotenia coriiceps* and *Nothotenia rossii*. **Journal of Thermal Biology**, v. 68, n. February, p. 110–118, 2017.

KOAKOSKI, G.; OLIVEIRA T.A.; ROSA, J.G.S.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L.C.; BARCELLOS L.J.G. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. *Physiology and Behavior*. v. 106 (2), p.129-132,2012.

KREISS, C.M.; MICHAEL, K. LUCASSEN, M.; JUTFELT, F.; MOTYKA, R.; DUPONT,S.;PÖRTNER, H.O. Ocean warming and acidification modulated energy budget and gill ion regulatory mechanisms in Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Journal of Comparative Physiology part B**. v.185, n. 7, p. 767-781, 2015.

KÜLTZ, D.; SOMERO, G. N. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 1883-1894, 1995.

LABORDE, E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. **Cell Death Difer.** v.17(9), p. 1373-1380, 2010.

LAUGHLIN S. B.; STEVENINCK, R. R. DE R. V.; ANDERSON, J. C. The metabolic cost of neural information. **Neuroscience**, v.1, n.1, 1998.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**. v. 233, p. 346–357, 1994.

LOGAN, C. A.; SOMERO, G. N. Transcriptional responses to thermal acclimation in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper 1864). **American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology** .v. 299, 2010

LOGAN, C. A.; SOMERO, G. N. Effects of thermal acclimation on transcriptional responses to acute heat stress in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper). **American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**. v.300, 2011.

LOWE, C. J.; DAVISON, W. Plasma osmolarity, glucose concentration and erythrocyte responses of two Antarctic nototheniid fishes to acute and chronic thermal change. **Journal of Fish Biology**. v. 67, p.752-766, 2005.

LU, G. D. The metabolism of piruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood piruvate. **Biochemical Journal**, v. 33, p. 249-254, 1939.

MACHADO, C.; ZALESKI, T.; RODRIGUES, E.; CARVALHO, C. D. S.; CADENA, S. M. S. C.; GOZZI, G. J.; KREBSBACH, P.; RIOS, F. S'A.; DONATTI, L. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Nothotenia coriiceps* and *Nothotenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**. v.172–173, p.21–28, 2014.

MADEIRA, C.; MADEIRA, D.; DINIZ, M.S.; CABRAL, H.N.; VINAGRE, C. Thermal acclimation in clown fish and multi-tissue experimental approach. **Ecological Indicators**. v.71, p.280-292, 2016.

MARSHALL, W. S.; GROSELL, M. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. **The Physiology of fishes**, v. 3, p. 177-230, 2006.

MEREDITH, M. P.; KING, J. C. Rapid climate change in the ocean west of the Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century. **Geophysical Research Letters**, v. 32, n. 19, p. 1–5, 2005.

MOMMSEN, T. P. Metabolism of the Fish Gill. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (eds) **Fish Physiology**. Vol. XB. Orlando: Academic Press, 1984. p. 203-237.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, n. 3, p. 211–268, 1999.

MUELLER, I. A.; DEVOR, D. P.; GRIM, J. M.; BEERS, J. M.; CROCKETT, E. L.; O'BRIEN, K. M. Exposure to critical thermal maxima increases oxidative

stress in hearts of white- but not red-blooded Antarctic notothenioid fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 20, p. 3655–3664, 2012

NAVARRO, I.; ROJAS, P.; CAPILLA, E.; ALBALAT, A.; CASTILLO, J.; MONTSERRAT, N.; CODINA, M.; GUTIÉRREZ, J. Insights into insulin and glucagon responses in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, 27: 205–216, 2002.

NISH, T.; FORGAC, M. The vacuolar (H⁺)-ATPases nature's most versatile proton pumps. **Nature reviews in Molecular and Cellular biology**, v. 3, n. 2, p.94-103, 2002.

OLIVA, M.; NAVARRO, F.; HRBACEK, F.; HERNANDEZ, A.; NYVLT, D.; PEREIRA, P.; RUIZ-FERNANDEZ, J.; TRIGO, R. Recent regional climate cooling on the Antarctic Peninsula and associated impacts on the cryosphere, **Science Total Environmental**. 2016

PANKHURST, N. W. The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 265–275, 2011

PECK, L. S. Ecophysiology of Antarctic marine ectotherms: limits to life. **Polar Biology**, v. 25, p. 31-40, 2002.

PECK, L.S.; WEBB, K.E.; BAILEY, D.M. Extreme sensitivity of biological function to temperature in Antarctic marine species. **Functional Ecology**, v.18, p.625-630, 2004.

PECK, L.S.; CLARK, M.S.; MORLEY, S.A.; MASSEY, A.; ROSSETTI, H. Animal temperature limits and ecological relevance: effects of size, activity and rates of change. **British Ecological Society: Functional Ecology**.v.3, n.2, p.248-256, 2009.

PECK, L.S. Organisms and responses to environmental change. **Marine Genomics**.v. 4, p. 237-243, 2011.

PECK, S.L.; MORLEY, S.A.; RICHARD, J.; CLARK, M.S. Acclimation and thermal tolerance in Antarctic marine ectotherms. **Journal of Experimental Biology**. v.217, p.16-22. 2014.

PERES, H.; COSTAS, B.; PEREZ-JIMENEZ, A.; GUERREIRO, I.; OLIVATELES, A. Reference values for selected hematological and serum biochemical parameters of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles under intensive aquaculture conditions. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 31, n. 1, p. 65–71, 2015.

PETRICORENA, Z.L.; SOMERO, G.N. Biochemical adaptations of notothenioid fishes: comparisons between cold temperate South American and New Zealand species and Antarctic species. **Comparative Biochemistry and Physiology, part A: Molecular and Integrative Physiology**.v. 147, p.799–807,2007.

PERRY, S. F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIN, J. C.; JENSEN, F. B. (eds.). *Fish Ecophysiology*. London: Chapman; Hall, 1993. p. 231-264.

PERRY, S. F.; BEYERS, M. L.; JOHNSON, D. A. Cloning and molecular characterisation of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) vacuolar H⁺- ATPase B subunit. **Journal of Experimental Biology**. v. 203, p. 459-470, 2000.

PETZEL, D. Drinking in Antarctic fishes. **Polar Biology**, v. 28, n. 10, p. 763–768, 2005.

PLACE, S.P.; ZIPPAY, M.L.; HOFMANN, G.E. Constitutive roles for inducible genes: evidence for the alteration in expression of the inducible hsp70 gene in Antarctic notothenioid fishes. **American Journal of Physiology**. v. 287, p.429-R436, 2004.

PODRABSKY, J. E.; SOMERO, G. N. Inducible heat tolerance in Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**. v. 30, p. 39–43, 2006.

PÖRTNER H.O. Physiological basis of temperature-dependent biogeography: trade-offs in muscle design and performance in polar ectotherms. **The Journal of Experimental Biology**. v. 205, p.2217–2230, 2002.

PÖRTNER, H.O.; PECK, L.S.; SOMERO, G. Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. **Philosophy Transactions of Royal Society part B**. v. 362.2007

PÖRTNER, H.O.; PECK, M.A. Climate change affects on fish and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. **Journal of fish Biology**. v.77, n.8, p.1745-1779. 2010.

PRZEPIURA, T.C.S.; HERRERIAS, T.; KANDALSKI, P.K.; ZALESKI, T.; MACHADO, C.; FORGATI, M.; DONATTI, L. Metabolic responses in Antarctic Nototheniidae brains subjected to thermal stress. **Brain Research**. 2019

QIU, J.Climate change. winds of change. **Science**. v.338,p.879–881.2012.

R: DEVELOPMENT CORE TEAM (2013) A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-90051-07-0.URL R-Project.org.

RAGA, G.; PICHLER, H. A.; ZALESKI, T.; DA SILVA, F. B. V.; MACHADO, C.; RODRIGUES, E.; KAWALL, H. G.; RIOS, F. S.; DONATTI, L. Ecological and physiological aspects of the antarctic fishes *Nothotenia rossii* and *Nothotenia coriiceps* in Admiralty Bay, Antarctic Peninsula. **Environmental Biology of Fishes**, v. 98, n. 3, p. 775–788, 2015.

RENWICK, J.A. Southern hemisphere circulation and relations with sea ice and sea surface temperature. **Journal of Climate**. v.15, p.3058-3068, 2002

RITO, J.; VIEGAS, I.; PARDAL, M. A.; JONES, J. G. Evidence of extensive plasma glucose recycling following a glucose load in seabass. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. v.211, p.41–48, 2017

RODRIGUES JR, E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M.; VANI, G. S.; SUDA, C. N. K.; CARVALHO, C. S.; DONATTI, L.; LAVRADO, H. P.; RODRIGUES, E. Interaction of warm acclimation, low salinity, and trophic fluoride on plasmatic constituents of the Antarctic fish *Nothotenia rossii* Richardson, 1844. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1591-1601, 2013.

RODRIGUES Jr E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M. SUDA, C. N. K.; VANI, G. S.; DONATTI, L. RODRIGUES, E.; LAVRADO, H. P. Metabolic responses of the Antarctic fishes *Nothotenia rossii* and *Nothotenia coriiceps* to sewage pollution. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 41, n. 5, p. 1205-1220, 2015.

SABER, T. H. Histological adaptation to thermal changes in gills of common carp fishes *Cyprinus carpio* L. Rafidain. **Journal of Science**. v. 22, p. 1-16, 2011.

SABOROWSKI, I. R.; BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, v. 140, p. 557-565, 2002.

SANDERSFELD, T.; DAVISON, B.; LAMARE, M.; KNUST, R.; RICHTER, C.. Elevated temperature causes metabolic trade-offs at the whole organism level in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **The Journal of experimental biology**. v. 218, 2015

SATTIN, G.; BAKIU, R.; TOLOMEO, A. M.; CARRARO, A.; COPPOLA, D.; FERRO, D.; SANTOVITO, G. Characterization and expression of a new cytoplasmic glutathione peroxidase 1 gene in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Hydrobiologia**, v.761, n.1, p. 363-372, 2015.

SEEBACHER, F.; WHITE, C.R.; FRANKLIN, C.E. Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. **Nature Climate Change**. v.5, p.61-66, 2015.

SEDILAK, J.; LINDSAY, R.H.C. Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. **Analytical Biochemistry**, 25: 192–205, 1968.

SIDELL BD, DRIEDZIC R, STOWE B, JOHNSTON A. Biochemical correlations of power development and metabolic fuel preferenda in fish hearts. **Physiology and Zoology**, v. 60, p.221– 232, 1987.

SIDELL, B. D. Intracellular oxygen diffusion: the roles of myoglobin and lipid at cold body temperature. **The Journal of Experimental Biology**. v. 201, p. 1118–1127, 1998.

SK, U.H.; BHATTACHARYA, S. Prevention of cadmium induced lipid peroxidation, depletion of some antioxidative enzymes and glutathione by series of novel **organoselenocyanates** **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, p.298–308, 2006.

SOENGAS, J.L.; ALDEGUNDE, M. Energy metabolism of fish brain. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**. v. 131,p. 271–296, 2002

SOMERO, G. N.; DE VRIES, A. L. Temperature tolerance of some antarctic fishes. **Science**, v. 156, p. 257, 1967.

SOMERO, G. The physiology of climate change: How potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. **The Journal of experimental biology**. v.213, p.912-20, 2010.

SOUZA, M. R. D. P.; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; MACHADO, C.; SILVA, D. T.; PIECHNIK, C. A.; MOURA, M. O.; DONATTI, L. Heat stress in the heart and muscle of the Antarctic fishes *Nothotenia rossii* and *Nothotenia coriiceps*: Carbohydrate metabolism and antioxidant defence. **Biochimie**, v. 146, p. 43-55, 2018.

STASTNA, V. Spatio-temporal changes in surface air temperature in the region of the northern Antarctic Peninsula and south Shetland islands during 1950–2003. **Polar Science**.v.4, p.18-33, 2010

STONE, D.A.J.Dietary carbohydrate utilization by fish. **Reviews of Fisheries Science**.v. 11,p. 337-369, 2003

STROBEL, A.; BENNECK, S.; LEO, E.; MINTERBECK, K.; PÖRTNER, H.O.; MARK, F.C. Metabolic shifts in the Antarctic fish *Nothotenia rossii* in response to rising temperature and PCO₂. **Frontiers of Zoology**. v.9, n. 28.2012

STROBEL, A.; LEO, E.; P6ORTNER, H.O.; MARK, F.C. (2013) Elevated temperature and PCO₂ shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of *Nothotenia rossii*. **Comparative Biochemistry Physiology part B**. v.166, p.48–57, 2013.

SUNDAY, J.M.; BATES, A.E.; KEARNEY, M.R.; COLWELL, R.K.; DULVY, N.K.; LONGINO, J.T.; HUEY, R.B. Thermal-safety margins and the necessity of thermoregulatory behavior across latitude and elevation. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 111, n.15. p. 5610-5615, 2014.

TAPIERO H, TEW KD. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine Pharmacotherapy**. V. 57(3-4), p:145-155, 2003.

THIBERT-PLANTE, X.; HENDRY, A.P. The consequences of phenotypic plasticity for ecological speciation. **Journal of Evolutionary Biology**. v. 24, p.326–342, 2011.

THORNE, M.A.S.; BURNS, G.; FRASER, K.P.P.; HILLYARD, G.; CLARK, M.S. Transcription profiling of acute temperature stress in the Antarctic plunderfish *Harpagifer antarcticus*. **Marine Genomics**. v.3, n.1,p. 35-44, 2010.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.85, n.3, p.603-611, 2005.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASEERMAN, D.H.; The liver. **Current Biology**. v.27, n.21, p.1147-1151, 2017.

TSENG, Y. C.; HWANG, P. P. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, n. 4, p. 419-429, 2008.

TURNER, J.; COLWELL, S.R.; MARSHALL, G.J.; LACHLAN-COPE, T.A.; CARLETON, A.M.; JONES, P.D.; LAGUN, V.; REID, P.A.; IAGOVKINA, A, S. Antarctic climate change during the last 50 years. **International Journal of Climatology**, v.25, p.279-294, 2005.

URSCHEL, M. R.; O'BRIEN, K. M. Mitochondrial function in Antarctic notothenioid fishes that differ in the expression of oxygen-binding proteins. **Polar biology**, v. 32, n. 9, p. 1323-1330, 2009.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**.v.77: p.325-333, 1981.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, p.591-625, 1997.

WILSON, R. S.; KUCHEL, L. J.; FRANKLIN, C. E.; DAVISON, W. Turning up the heat on subzero fish: Thermal dependence of sustained swimming in an Antarctic notothenioid. **Journal of Thermal Biology**, v. 27, n. 5, p. 381–386, 2002.

WINDISCH, H. S.; FRICKENHAUS, S.; JOHN, U.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. O.; LUCASSEN, M. Stress response or beneficial temperature acclimation: Transcriptomic signatures in Antarctic fish (*Pachycara brachycephalum*). **Molecular Ecology**, v. 23, n. 14, p. 3469–3482, 2014.

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**. v. 60, p. 340–347, 2002.

YAMASHITA, M.; YABU, T.; OJIMA, N. Stress protein Hsp70 in fish. **AquaBioScience Monographs**. v. 3, n. 4, p. 111-141, 2010.